

HOVEDFAGSOPPGAVE I FARMAKOLOGI FOR GRADEN *CAND.PHARM.*

**Virkningen av ampicillin,  
et  $\beta$ -laktamantibiotikum, på  
glutamattransportørnivåer i rottehjerne**

*Studier av svulstvekst og malonatinduserte og  
somaninduserte lesjoner i hjernen på ampicillin-  
behandlede rotter*

av

Eirin Andersen



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Oslo, oktober 2006

## FORORD

Denne hovedfagsoppgaven i farmakologi ble utført ved Forsvarets forskningsinstitutt, avdeling for beskyttelse og materiell, i perioden november 2005 til oktober 2006. Oppgaven er et ledd i *cand.pharm*-graden ved farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Først og fremst vil jeg takke min veileder Dr. Bjørnar Hassel for all hjelp og dyktig veiledning under arbeidet med oppgaven. Ditt engasjement og gode humør har hjulpet meg langt på vei.

Takk også til min interne veileder ved farmasøytisk institutt, professor Ragnhild E. Paulsen.

En stor takk rettes til Cecilie Morland for all hjelp og støtte dette året. Takk for opplæring i dyrking av celler, rottebehandling, hjernesnitting og ikke minst oppgaveskriving. Takk for at jeg fikk overnatte hos deg i perioder med lange dager. Din positive innstilling har bidratt til et hyggelig år.

Takk til Evy Grini Iversen for god opplæring, råd og hjelp under lab-arbeidet. Takk også til Siri Enger for hjelp med farging av snitt. Takk til fotoavdelingen ved Bjørn Fremstad for hjelp med fotografering av blott og hjernesnitt. Takk også til Jorunn, Laila og Anita for godt stell med rottene mine.

Jeg vil takke Forsvarets forskningsinstitutt som har stilt midler og utstyr til disposisjon, og til alle andre ansatte som har bidratt med hjelp når jeg har hatt behov for det.

Takk også til medstudent Bjørn Oddvar. Du har bidratt til et hyggelig år her, både sosialt og med oppmuntrende ord når forsøk gikk galt. Det har vært veldig koselig å dele kontor med deg!

I tillegg vil jeg også takke Bjørn Oddvar, Gunn, Cecilie og Nga for hyggelige middager og pauser, og alle andre på nybygget som har bidratt til et hyggelig år.

Til slutt vil jeg takke mamma og pappa for oppmuntring gjennom hele året. Takk til Jardar og Trude for at jeg fikk overnatte i perioder med lange dager. Takk til Jonas for ferdige middager da jeg kom hjem! Takk også for god tålmodighet, spesielt på slutten.

Kjeller, oktober 2006

Eirin Andersen

**INNHold**

<b>FORORD.....</b>	<b>2</b>
<b>INNHold.....</b>	<b>4</b>
<b>FORKORTELSER.....</b>	<b>8</b>
<b>SAMMENDRAG .....</b>	<b>10</b>
<b>1 INNLEDNING.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Bakgrunn.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Glutamat .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Syntese og metabolisme av glutamat .....	13
1.2.2 Glutamattransportører og glutamatopptak.....	14
1.2.3 Glutamatreseptorer og glutamatmediert nevrotoksisitet .....	15
<b>1.3 Ampicillin.....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Gliomer.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Valproat.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 Malonat .....</b>	<b>19</b>
<b>1.7 Soman .....</b>	<b>20</b>
<b>1.8 Sentrale hjernestrukturer og glutamattransportører.....</b>	<b>21</b>
1.8.1 Hippocampus .....	21
1.8.2 Corpus striatum.....	21
1.8.3 Cortex .....	21
1.8.4 Glutamattransportørene GLT og GLAST .....	22
<b>1.9 Problemstilling .....</b>	<b>23</b>
<b>2 MATERIALE OG METODER.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Forsøksdyr .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Kjemikalier .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Western blotting.....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Løsninger til Western blotting .....	28
2.3.2 Støping av geler .....	30
2.3.3 Gelelektroforese .....	30
2.3.4 Immunoblotting.....	30
2.3.5 Immunmerking.....	31

---

2.3.6	Kjemoluminesens-deteksjon.....	31
<b>2.4</b>	<b>Effekt av ampicillin på proteinekspresjon .....</b>	<b>32</b>
2.4.1	Disseksjon og homogenisering av hjernevev fra rotter behandlet med ampicillin .....	32
<b>2.5</b>	<b>Dyrking av C6 celler .....</b>	<b>33</b>
2.5.1	Splitting av C6 celler.....	33
2.5.2	Klargjøring av C6 celler til implantering .....	34
<b>2.6</b>	<b>Effekt av ampicillin og valproat på vekst av implanterte C6 celler i striatum hos rotte .....</b>	<b>34</b>
2.6.1	Implantering av C6 celler .....	34
2.6.2	Perfusjonsfiksering.....	35
2.6.3	Kryostatsnitting.....	35
2.6.4	HE-farging av kryostatsnitt.....	36
2.6.5	Måling av svulstvolum .....	37
2.6.6	Kvalitetskontroll av implanteringsmetoden.....	37
<b>2.7</b>	<b>Mikrodialyse av implantert gliom i striatum hos rotte.....</b>	<b>38</b>
2.7.1	Bufferer til mikrodialyse.....	38
2.7.2	Mikrodialyse .....	39
<b>2.8</b>	<b>Analyse av aminosyrer i mikrodialysat ved hjelp av HPLC .....</b>	<b>41</b>
2.8.1	Derivatisering med OPA .....	41
2.8.2	Separasjon av aminosyrer på HPLC .....	42
<b>2.9</b>	<b>Effekt av ampicillin på malonatindusert celledød i striatum hos rotte</b>	<b>43</b>
2.9.1	Injeksjon av malonat .....	43
<b>2.10</b>	<b>Effekt av ampicillin på rotter behandlet med soman .....</b>	<b>44</b>
2.10.1	Injeksjon av soman.....	44
2.10.2	Parafininfiltrasjon.....	44
2.10.3	Parafininnstøping av hjernebiter .....	45
2.10.4	Snitting av innstøpte hjerner.....	45
2.10.5	FluoroJade B-farging av parafinsnitt.....	46
<b>2.11</b>	<b>Tallbehandling .....</b>	<b>47</b>
2.11.1	Resultater .....	47
2.11.2	Statistikk .....	47

<b>3</b>	<b>RESULTATER .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Effekt av ampicillin-behandling på GLT og GLAST i rottehjerne.....</b>	<b>48</b>
3.1.1	GLT-nivå i hippocampus.....	48
3.1.2	GLAST-nivå i hippocampus.....	50
3.1.3	GLT-nivå i striatum.....	51
3.1.4	GLAST-nivå i striatum.....	52
3.1.5	GLT-nivå i frontal- og/eller parietalcortex.....	53
3.1.6	GLAST-nivå i frontal- og/eller parietalcortex .....	54
<b>3.2</b>	<b>Effekt av langtids ampicillin- og valproat-behandling på vekst av C6 celler implantert i striatum hos rotter .....</b>	<b>55</b>
3.2.1	Effekt av ampicillin på vekst av C6 celler i rottehjerne .....	56
3.2.2	Effekt av valproat på vekst av C6 celler i rottehjerne .....	57
<b>3.3</b>	<b>Mikrodialyse av implanterte C6 celler i høyre striatum hos rotte .....</b>	<b>58</b>
3.3.1	Ampicillins effekt på ekstracellulær glutamat i svulstvev .....	58
3.3.2	Valproats effekt på ekstracellulær glutamat i svulstvev.....	60
<b>3.4</b>	<b>Ampicillin-behandlingens effekt på atferd og vekt.....</b>	<b>61</b>
<b>3.5</b>	<b>Valproat-behandlingens effekt på atferd og vekt .....</b>	<b>62</b>
<b>3.6</b>	<b>Effekt av ampicillin-behandling på malonattoksisitet i striatum hos rotte .....</b>	<b>63</b>
<b>3.7</b>	<b>Effekt av ampicillin-behandling på somanforgiftning i rottehjerne ....</b>	<b>64</b>
3.7.1	Atferd hos rotter behandlet med soman .....	64
3.7.2	Studie av degenererte nevroner i hippocampus .....	65
<b>4</b>	<b>DISKUSJON.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Analyse av GLT og GLAST i ulike hjernestrukturer .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Ampicillins evne til å passere blod-hjerne-barrieren .....</b>	<b>68</b>
<b>4.3</b>	<b>Effekten av ampicillin og valproat på implanterte C6 celler .....</b>	<b>69</b>
4.3.1	Ampicillin og valproat stimulerer svulstvekst snarere enn å hemme den .....	69
4.3.2	Ampicillin og valproat reduserer ikke ekstracellulær glutamat i svulstvev .....	71
4.3.3	Gyldigheten av C6 gliomer som modell for gliomer hos menneske...	72
<b>4.4</b>	<b>Ampicillin-behandling hadde ingen effekt på lesjonsvolumet i striatum etter injeksjon av malonat.....</b>	<b>73</b>

4.5	Ampicillin-behandling kunne ikke motvirke somanforgiftning.....	74
4.6	Mulig virkningsmekanisme for ampicillin.....	75
4.7	Kan ampicillin ha en gunstig effekt ved epilepsi?.....	75
<b>KONKLUSJON .....</b>		<b>76</b>
<b>REFERANSER .....</b>		<b>77</b>

**FORKORTELSER**

ACh	Acetylkolin
AChE	Acetylkolinesterase
AMP	Ampicillin
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metyl-4-isoxazolpropionat
ATP	Adenosin 5'-trifosfat
BBB	Blod-hjerne-barrieren
cAMP	Syklisk AMP (adenosin 3',5'-monofosfat)
CNS	Sentralnervesystemet
DAG	Diacylglycerol
EAAC	Eksitatorisk aminosyrebærer
EAAT	Eksitatorisk aminosyretransportør
GABA	$\gamma$ -amino smørsyre
GLAST	Glutamat-aspartattransportør
GLT	Glutamatttransportør
GS	Glutamin syntetase
HE	Hematoxylin/eosin
HI-6	(4-karbamoyl-2'-((hydroxyimino)metyl)-1,1'- oksydimetylenbis(pyridiniumklorid))
HPLC	High performance liquid chromatography (væskeskromatografi)
HRP	Horse raddish peroxydase (pepperrotperoksidase)
i.p.	Intraperitonealt
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 trifosfat
KTR	Kontroll
LD <sub>50</sub>	Dødelig dose for 50 % av forsøksdyrene
NMDA	N-metyl-D-aspartat
OP	Organofosfater
PaG	Fosfataktivert glutaminase
PI-PLC	Fosfoinositid-spesifikk fosfolipase C
PKC	Protein kinase C
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
rpm	Rotasjoner per minutt



s.c.	Subkutant
SDH	Suksinat dehydrogenase
SD	Standardavvik
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide-gel electrophoresis
TBOA	Treo- $\beta$ -benzyloksyaspargat
VPA	Valproat

## SAMMENDRAG

Nerveceller er svært følsomme for forhøyede ekstracellulære nivåer av neurotransmittoren glutamat. En overstimulering av glutamatreseptorer kan føre til eksitotoksisitet med overbelastning av nervecellene med  $\text{Ca}^{2+}$ - og  $\text{Na}^{+}$ -ioner. Rundt hjernesvulster kan glutamatnivået øke, fordi svulstcellene avgir glutamat gjennom cystin-glutamat antiporterene. Ved hemmet ATP-produksjon reduseres ionegradientene som driver glutamatopptaket, slik at glutamat frigjøres fra cellene gjennom reversert transport og fører til eksitotoksisitet. Ved nervegassforgiftning øker aktiviteten av glutamaterge nervoner, slik at glutamatfrigjøringen når eksitotoksiske nivåer. I dette arbeidet studerte vi om behandling med ampicillin (AMP) kan øke vevsnivået av glutamattansportørene GLT og GLAST i rottehjerne, og om en slik økning kan dempe vekst av hjernesvulster, redusere toksisiteten av malonat, en hemmer av suksinat dehydrogenase (SDH), og redusere symptomer og hjerneskade etter forgiftning med nervegassen soman. AMP-behandling (100 mg/kg x 2 i 5 eller i 10 dager) av rotter ga en oppregulering i GLT-nivået i hippocampus og i parietalcortex, målt ved immunoblotting. GLAST-ekspresjonen økte i parietalcortex og i striatum. Rotter med implanterte C6 gliomceller ble behandlet med AMP (100 mg/kg x 2 i 14 dager) eller valproat (VPA; 300 mg/kg x 2 i 14 dager). Begge behandlingene ga en økning i svulstvolum i parietalcortex sammenliknet med kontrollgruppen (NaCl, 0,9 % x 2 i 14 dager). Verken AMP- eller VPA-behandling ga redusert glutamatnivå ekstracellulært målt ved mikrodialyse. Rotter behandlet med AMP (100 mg/kg x 2 i 10 dager forut for, og 2 dager etter intrastriatal injeksjon av malonat) fikk like store malonatinduserte lesjoner som kontrollrotter behandlet med NaCl. AMP-behandling (100 mg/kg x 2 i 10 dager) ga ingen synlig forskjell i symptomer eller nervecelleskade i hippocampus etter injeksjon av soman ( $180 \mu\text{g/kg} = 2,25 \text{ LD}_{50}$ ) sammenliknet med NaCl-behandlede rotter. På bakgrunn av denne studien kan man ikke si at AMP har potensial i behandling av eksitotoksiske tilstander.

# 1 INNLEDNING

## 1.1 Bakgrunn

Nerveceller er svært følsomme for forhøyede ekstracellulære nivåer av den eksitatoriske neurotransmitteren glutamat (Szatkowski et al., 1990). Overstimulering av glutamatreseptorer fører til eksitotoksisitet. Den spenningsstyrte  $Mg^{2+}$ -blokkaden i NMDA-reseptorens  $Ca^{2+}$ -kanal oppheves og nervecellene overbelastes med  $Ca^{2+}$ - og  $Na^{+}$ -ioner (Choi, 1992; Zeevalk and Nicklas, 1992). Glutamatmediert eksitotoksisitet antas å være en mekanisme ved mange typer nevrodegenerasjon. Det er vist at primære, maligne hjernesvulster av gliomtype frigjør eksitotoksiske mengder glutamat gjennom cystin-glutamat antiporterene (Ye et al., 1999), og slik dreper omliggende hjernevev (Takano et al., 2001; Sontheimer, 2003). Hemming av energimetabolismen fører til ekstracellulær akkumulering av glutamat, fordi glutamattransportører reverseres når ionegradientene over cellemembranen reduseres som følge av svikt i ATP-produksjonen. Intracerebral injeksjon av malonat, en reversibel hemmer av suksinat dehydrogenase (SDH), fører til hemming av ATP-produksjonen, effluks av glutamat og glutamatmediert nevrodegenerasjon (Messam et al., 1995; Morland et al., 2004). Ved nervegassforgiftning hemmes enzymet acetylkolinesterase (AChE), som igjen fører til akkumulering av acetylkolin (ACh) i synapsespalten og stimulerer til massiv frigjøring av glutamat som igjen fører til eksitotoksisitet og nevrodegenerasjon (van Helden and Bueters, 1999; Myhrer et al., 2005).

Et aktuelt angrepspunkt for behandling av nevrodegenerasjon er bruk av NMDA- eller AMPA-reseptorantagonister (Choi, 1988). Disse er foreløpig ikke i utstrakt bruk i humanmedisinen ved nevrodegenerasjon da de bl.a. gir uheldige bivirkninger som kognitive forstyrrelser og ataksi. Glutamattransportører er viktige for å hindre at glutamat akkumulerer ekstracellulært og gir eksitotoksisitet (Rothstein et al., 1996). En måte å redusere eller hindre glutamatmediert nevrodegenerasjon på kunne være å øke uttrykket av glutamattransportørnivåer. Da ville glutamat kunne fjernes raskere fra ekstracellulærrommet, inkludert synapsespalten, og man kunne redusere

sannsynligheten for eksitotoksisitet. Det er nylig vist at  $\beta$ -laktamantibiotika, deriblant ampicillin (AMP), stimulerer ekspresjon av glutamattransportøren GLT i rottehjerne (Rothstein et al., 2005). Dette funnet peker på muligheten for å øke mengden glutamattransportører i hjernen farmakologisk.

I denne studien ville vi undersøke om AMP-behandling fører til en oppregulering av glutamattransportører i ulike hjernestrukturer. Videre ville vi se om AMP-behandling hadde noen effekt på svulstvekst, malonatinduserte hjernelesjoner og somaninduserte kramper som alle har eksitotoksisitet som fellesnevner.

## 1.2 Glutamat

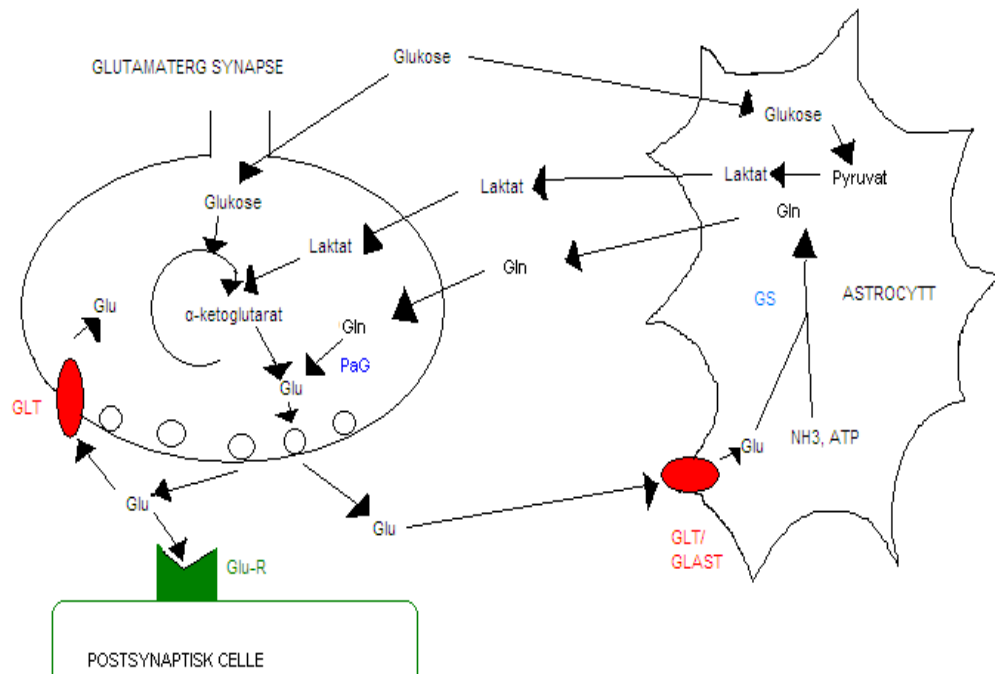
Glutamat er den kvantitativt viktigste eksitatoriske nevrotransmitteren i pattedyrhjerne og antas å være involvert i de fleste normale hjernefunksjoner (Fonnum, 1984), siden 80-90 % av nevronene i hjernen bruker glutamat som nevrotransmittor (for oversikt, se Hassel and Dingledine, 2006). Glutamatkonsentrasjonen er høyere i grå substans (10-15  $\mu\text{mol/g}$  vev) enn i hvit substans (4-6  $\mu\text{mol/g}$ ). Glutamatgradienten over cellemembranen er stor da den ekstracellulære konsentrasjonen bare er ca. 10  $\mu\text{M}$ , mens den i cytosol er ca. 10 mM (for oversikt, se Danbolt, 2001). Det er viktig å holde det ekstracellulære glutamatnivået i hvilesituasjonen lav, fordi glutamatreseptorene er avhengig av en høy signal/støyratio for å kunne reagere på konsentrasjonsendringene ved synaptisk frigjøring av glutamat (Schoepp and Conn, 1993; Seeburg, 1993). Dessuten kan overstimulering av glutamatreseptorene føre til celledød (Choi, 1992).

Glutamat lagres i synaptiske vesikler i nerveterminalen i glutamaterge nevroner. En  $\text{H}^+/\text{ATPase}$  i vesikkelmembranen driver opptaket til vesiklene, og den er dessuten avhengig av  $\text{Mg}^{2+}$ . Når cellemembranen depolariseres frigjøres glutamat til synapsespalten ved hjelp av  $\text{Ca}^{2+}$ -avhengig eksocytose. Det er også blitt vist at ekstracellulær glutamat til en viss grad frisettes non-synaptisk, bl.a. via glutamat-cystin-antiporteren (Baker et al., 2002).

### 1.2.1 Syntese og metabolisme av glutamat

Glutamat kan dannes både i nevroner og i astrocytter. I begge celletyper kan glutamat syntetiseres fra Krebs'-syklus-intermediaten  $\alpha$ -ketoglutarat gjennom transaminering ved transaminaser. Astrocytter tar opp nevronalt transmittorglutamat og omdanner det til glutamin via glutamin syntetase (GS) (Martinez-Hernandez et al., 1977). Glutamin frisettes til ekstracellulærvæsken og kan tas opp i nevroner. I nevronene metaboliseres glutamin til glutamat via fosfataktivert glutaminase (PaG) (Patel and Olson, 1982). Denne kjeden av reaksjoner kalles glutamat-glutaminsyklus og er skissert i fig. 1.1. Ca. 40 % av glutamatmetabolismen i nevroner går via glutamat-glutaminsyklus, så denne syklusen ser ut til å være viktig for å opprettholde normal cellefunksjon.

Astrocytter kan også metabolisere nevronalt transmittorglutamat via en annen rute. Etter opptak kan glutamat omdannes til  $\alpha$ -ketoglutarat, som videre, via Krebs'-syklus, omdannes til malat. Malat kan dekarboksyleres til pyruvat og reduseres til laktat. Slik kan astrocyttene omdanne glutamat til både glutamin og laktat, som begge frigjøres til ekstracellulærvæsken og kan tas opp av nevroner (Hassel and Sonnewald, 1995). Det er usikkert hvor viktig glutamin er for dannelsen av glutamat, siden glutamaterge nevroner kan frisetts glutamat uten tilgang på glutamin. Dette skyldes deres evne til *de novo* syntese av glutamat fra Krebs'-syklus, noe som krever pyruvatkarboksylering (Hassel and Bråthe, 2000). Siden opptaket av aminosyrer i hjernen er mye mindre enn glukoseopptaket, må aminogruppen i glutamat gjenvinnes, mens karbonskjelettet brytes ned til CO<sub>2</sub> og vann i nevroner (Hassel and Dingledine, 2006).



**Figur 1.1 Glutamat-glutaminsyklus og energimetabolisme**

Figuren viser en glutamaterg synapse. Glutamat (Glu) syntetiseres fra glukose via glykolyse og Krebs'-syklus og tas opp i vesikler. Ved eksocytose frigjøres glutamat ut i synapsespalten og kan bindes til glutamatreseptorer (Glu-R) postsynaptisk. Glutamaterg transmisjon avsluttes ved at glutamat fjernes fra synapsespalten. Det skjer i noe grad ved reopptak til nevroner via GLT, men hovedsakelig ved opptak i astrocytter via GLT eller GLAST. I astrocytter omdannes glutamat til glutamin (Gln) via enzymet glutamat syntetase (GS). Glutamin frisettes til ekstracellulærvæsken hvor det tas opp av nevroner og omdannes til glutamat via enzymet fosfataktivert glutaminase (PaG). Astrocytter har relativt høy glykolytisk aktivitet i forhold til Krebs'-syklus aktiviteten og produserer dermed laktat. Laktat som skilles ut ekstracellulært tas opp av nevroner og metaboliseres der.

### 1.2.2 Glutamattransportører og glutamatopptak

Opptak av glutamat over plasmamembranen foregår via spesielle transportørproteiner i EAAT-familien (eksitatorisk aminosyretransportør). Fem ulike transportører er klonet: GLAST (EAAT<sub>1</sub>) (Storck et al., 1992), GLT (EAAT<sub>2</sub>) (Pines et al., 1992), EAAC<sub>1</sub> (EAAT<sub>3</sub>) (Kanai and Hediger, 1992), EAAT<sub>4</sub> (Fairman et al., 1995) og EAAT<sub>5</sub> (Arriza et al., 1997). Alle disse transportørene transporterer L-glutamat og

L- og D-aspartat. Opptak skjer mot glutamatgradienten og drives av den elektrokjemiske gradienten for  $\text{Na}^+$  (Levy et al., 1998).  $\text{Na}^+$ -gradienten opprettholdes av  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen. Glutamatopptaket er i tillegg avhengig av ekstracellulær  $\text{H}^+$  og intracellulær  $\text{K}^+$  (Kanner and Schuldiner, 1987). GLT og GLAST uttrykkes hovedsakelig i astrocyttmembranen og står for det meste av glutamatopptaket i sentralnervesystemet (CNS) (Lehre et al., 1995; Lehre and Danbolt, 1998). GLT er kvantitativt den viktigste glutamattransportøren i storhjernen (Danbolt et al., 1992; Haugeto et al., 1996). GLAST er dominerende i lillehjernen (Lehre and Danbolt, 1998). I tillegg har man påvist GLT, EAAC<sub>1</sub> og EAAT<sub>4</sub> i nevroner. Det nevronele opptaket er imidlertid langt lavere enn opptaket i gliaceller, selv om det kan være viktig for synaptisk håndtering av glutamat. De  $\text{Na}^+$ -avhengige glutamattransportørene både i nevroner og astrocytter kan under visse omstendigheter reverseres (Nicholls and Attwell, 1990).

### **1.2.3 Glutamatreseptorer og glutamatmediert nevrotoksisitet**

Glutamat har effekt på både ionotrope og metabotrope reseptorer. De ionotrope reseptorene består av AMPA- og kainatreseptorer som gir rask transmisjon, og av NMDA-reseptorer med langsommere respons (Danbolt, 1994). Disse er alle ligandstyrte ionekanaler, men er forskjellige med hensyn på agonist/antagonistbinding og ioneselektivitet. De tre klassene metabotrope glutamatreseptorer er alle koblet til intracellulære "second messengers" via G-proteiner. Klasse I stimulerer PI-PLC (fosfoinositid-spesifikk fosfolipase C) og gir med det økning i  $\text{IP}_3$  (inositol 1,4,5 trifosfat) og DAG (diacylglycerol).  $\text{IP}_3$  stimulerer frisetting av  $\text{Ca}^{2+}$  fra intracellulære lagre og DAG gir økt aktivering av PKC (protein kinase C). Klasse II og antakelig klasse III er negativt koblet til cyklisk AMP ved å hemme adenylyl cyklase (Hassel and Dingle, 2006).

Ved hemmet metabolisme og iskemi vil cellemembranen depolariseres (Szatkowski et al., 1990). Dette medfører redusert glutamatopptak og økt frisetting av transmittorglutamat og ikke-vesikulær glutamat fra den presynaptiske nerveterminalen til synapsespalten (Jabaudon et al., 1999). Glutamatreseptorer

postsynaptisk blir overstimulerte, noe som igjen kan føre til nevrotoksisitet (Choi, 1992). Toksisitet som følge av overstimulering av glutamatreseptorene kalles eksitotoksisitet. En mulig forklaring på eksitotoksisitet kan skyldes NMDA-reseptoren (Choi, 1988). Energisvikt fører til depolarisering og den spenningsstyrte  $Mg^{2+}$ -blokkaden i NMDA-reseptorens  $Ca^{2+}$ -kanal oppheves og cellen overbelastes med  $Ca^{2+}$ -ioner (Novelli et al., 1988; Zeevalk and Nicklas, 1992). Depolariseringen forsterkes av  $Na^{+}$ -influks via AMPA-reseptoren når glutamatnivået øker ekstracellulært. En annen mulig sammenheng mellom energisvikt og eksitotoksisitet er reversering av glutamattansportører i astrocyttene. Siden glutamatopptaket krever energi, vil en svikt i hjernens energiproduksjon hemme eller reversere opptak via disse transportørene. Når ATP-nivået synker, vil cellene ikke lenger være i stand til å opprettholde ionegradienten over membranen. Glutamatopptaket, som er avhengig av  $Na^{+}$ -gradienten, vil da hemmes og etter hvert reverseres. Det reverserte opptaket drives av den transmembrane gradienten for glutamat (Nicholls and Attwell, 1990).

### 1.3 Ampicillin

Ampicillinnatrium er et aminopenicillin og hører til gruppen  $\beta$ -laktamantibiotika. Det blir brukt mot infeksjoner forårsaket av ampicillinfølsomme mikroorganismer, spesielt ved urinveisinfeksjoner og gonorré, og virker ved at celleveggsyntesen hos bakterier hemmes. Nokså nylig er det vist at  $\beta$ -laktamantibiotika, deriblant AMP, stimulerer GLT proteinsyntese. Disse er dermed potensielle legemidler mot neurodegenerative sykdommer som involverer glutamattoksisitet, f.eks. amyotrofisk lateralsklerose (ALS), hjerneslag, hjernetumorer og epilepsi (Rothstein et al., 2005).  $\beta$ -laktamantibiotika er blant de mest brukte antibiotika i dag, og de har lenge vært kjent som metallionchelatorer. Mange neurologiske sykdommer, f.eks. Alzheimers sykdom og ALS, er assosiert med oksidativt stress (Barnham et al., 2004). Metallionchelatorer kan kanskje redusere oksidativt stress. Det er kjent at penicillin og dens derivater er  $Cu^{2+}$ -chelatorer. Behandling med  $\beta$ -laktamantibiotika virker derfor lovende ved bekjempelse av neurodegenerative sykdommer ved at de både øker GLT ekspresjon og binder metallioner (Ji et al., 2005).



## 1.4 Gliomer

Hjernesvulster deles inn i primære og sekundære typer. Primære hjernesvulster oppstår i vevet innenfor kraniet, mens sekundære er kreftceller som har spredt seg fra andre steder i kroppen, metastaser. Primære hjernesvulster kan kun utvikles fra celler som er i vekst. Nerveceller kan derfor ikke bli til kreftceller siden disse cellene har gått permanent ut av cellesyklus (Sontheimer, 2004). Gliomer er primære hjernesvulster som oppstår pga. en malign forandring av astrocytter, oligodendrocytter eller deres stamceller (Adams, 1980; Sontheimer, 2003). Gliomceller beveger seg aktivt gjennom de trange ekstracellulærområdene i hjernen. Svulststørrelsen begrenses av hodeskallen, og en voksende svulst må ødelegge vevet rundt for at det skal bli plass til den. Det er vist at gliomceller frigjør eksitotoksiske mengder glutamat som tilrettelegger for økt vekst (Ye and Sontheimer, 1999; Takano et al., 2001; Sontheimer, 2003). Det antas at glutamatfrigjøring skjer som følge av cystinopptak via system  $x_c^-$ , en elektronøytral cystin-glutamat antiporter. System  $x_c^-$  er den eneste mulige veien for cystin-opptak i gliomer (Ye et al., 1999; Chung et al., 2005). Cystin er en essensiell forløper for glutation, et molekyl som beskytter celler mot endogene reaktive oksygenforbindelser (ROS).

Prognosen ved hjernesvulster er veldig varierende, og avhenger av bl.a. svulsttype, alder og allmenntilstand. Jo eldre man er, desto dårligere er prognosen. Lavgradige gliomer (astrocytomer, oligodendrogliomer og blandingstyper) vokser langsomt og er ikke så aggressive. Svulstene gir svært ofte epilepsi og rammer oftest dem mellom 25 og 40 år. Høygradige gliomer (anaplastiske gliomer og glioblastomer) vokser mye fortere og har alvorligere prognose. De rammer oftest personer mellom 40 og 70 år (Kræftens Bekæmpelse, 2006).

I denne oppgaven er det brukt C6 celler, en cellelinje med astrocytt som utgangspunkt, som modell for gliomer. Disse cellene er nyttige fordi de vokser så raskt. Implantering av C6 gliomceller i striatum hos rotte har tidligere gitt utvikling av svulster i løpet av 14 dager (Bouzier et al., 1999; Morland et al., 2004).

## 1.5 Valproat

Natriumvalproat er natriumsaltet av den forgrenede fettsyren 2-propyl-1-pentansyre, og er et av de mest brukte legemidlene mot epilepsi, både ved partielle og generaliserte anfall. De siste årene har stoffet vist seg å ha effekt mot andre sykdommer som bipolare lidelser, akutte manier, nevrogen smerte og migrene (Löscher, 1999; Johannessen, 2000). De forskjellige indikasjonene er antakelig knyttet til stoffets mange ulike virkningsmekanismer. Hemming av GABA-erg signalering kan forårsake epileptiske anfall (Johannessen, 2000). I dyremodeller gir valproat (VPA) en moderat økning i ekstracellulært nivå av GABA (Petroff et al., 1999). Dette skyldes både økt frisetting av transmittor-GABA (Gram, 1988) og endringer av effekten til enzymer som GABA-transaminase og suksinat semialdehyd dehydrogenase. Disse enzymene er involvert i metabolismen av GABA. Forsøk indikerer at VPA har en direkte effekt på membranpotensialet ved en bruksavhengig blokkering av  $\text{Na}^+$ -kanaler, det vil si at repetitive høyfrekvente aksjonspotensialer hemmes (McLean and Macdonald, 1986). Dette kan forklare VPAs krampedempende effekt.

Langtidsbehandling med VPA har vist å gi oppregulering av GLT (Hassel et al., 2001; Morland et al., 2004). I tillegg reduserer VPA NMDA-reseptormediert glutamattoksisitet (Ko et al., 1997; Löscher, 1999). Mekanismen er ikke kjent, men redusert fosforylering av NMDA-reseptorens NR2B subenhet er vist ved litiumbehandling og er foreslått som mekanisme også for VPA (Hashimoto et al., 2002). VPA reduserer celledeling, stimulerer celledifferensiering og ser ut til å ha effekt mot visse kreftformer i dyrestudier (Blaheta and Cinatl, 2002). Disse effektene er knyttet til VPAs evne til å påvirke mange intracellulære signalproteiner. Det har blitt vist at VPA hemmer histondeacetylaser, enzymer involvert i transkripsjonsregulering og kreftutvikling (Göttlicher et al., 2001). Mye tyder på at hemming av disse enzymene kan virke nevroprotektivt (Phiel et al., 2001; Ren et al., 2004).

## 1.6 Malonat

Dikarboksytsyren malonat er en reversibel hemmer av SDH (Greene et al., 1993; Messam et al., 1995). Siden SDH er et sentralt enzym i både Krebs'-syklus og i elektrontransportkjeden, gir en hemming av dette enzymet nedsatt nevronal energimetabolisme, som videre fører til celledød pga. glutamatoverstimulering (Greene et al., 1993). Forsøk tyder på at malonatopptaket er nevrons spesifikt (Hassel et al., 2002; Morland et al., 2004). Ved å bruke malonat som metabolsk toksin kan man dermed få en spesifikk hemming av den nevronale metabolismen, mens den astrocyttiske metabolismen antakelig er intakt. Intrastriatal injeksjon av malonat fører til ekstracellulær akkumulering av glutamat (Messam et al., 1995) og videre til NMDA-reseptormediert celledød. Den eksitotoksiske lesjonen som oppstår (Greene et al., 1993) kan reduseres med NMDA-reseptorblokkeren MK-801 (Beal et al., 1993; Ferger et al., 1999). I andre studier har man ikke kunnet påvise reduksjon av malonat-toksisiteten med NMDA-blokkade, men man har funnet at lesjonsutbredelsen kan reduseres med AMPA-reseptorantagonister (Ikonomidou et al., 2000). Det finnes holdepunkter for at nedsatt energimetabolisme ved hemming av SDH gir redusert opptak av glutamat i vesikler (Tavares et al., 2001). Vesikulært opptak er ATP-avhengig og drives av den elektrokjemiske gradienten over vesikkelmembranen. Hemming av denne prosessen er antakelig knyttet til nedsatt ATP-produksjon. Redusert glutamatopptak i vesiklene kan være en av de toksiske effektene ved SDH-hemming. Det er også vist at malonat induserer dannelsen av ROS (Schulz et al., 1995) ved å hemme elektrontransportkjeden. Celledød pga. stereotaktisk mikroinjeksjon av malonat i striatum kan oppheves ved samtidig injeksjon av suksinat i overskudd (Ferber et al., 1999). Dette viser hvor viktig hemmingen av Krebs'-syklus er for malonattoksisitet. Det er også blitt vist at VPA øker GLT-nivået i striatum og reduserer lesjonsvolumet i striatum etter injeksjon av malonat (Morland et al., 2004).

## 1.7 Soman

Soman er en nervegass som tilhører gruppen organofosfater (OP) (Taylor, 1995; McDonough and Shih, 1997; Barthold and Schier, 2005). I normal kolinerg transmisjon frigjøres nevrotransmitteren ACh i synapsespalten ved depolarisering av presynaptisk kolinerg celle. Soman hemmer AChE irreversibelt eller reversibelt slik at ACh ikke blir brutt ned i synapsespalten. Det skjer ved at soman danner et reversibelt enzymhemmende kompleks, OP-AChE. Komplekset kan degraderes spontant slik at enzymet kan reaktiveres eller det kan gjennomgå en prosess kalt ”eldring”. Dette er en tidsavhengig dealkyleringsreaksjon som fører til irreversibel enzyminaktivering. Oksimer (f.eks HI-6) kan reaktivere bundet AChE ved å fjerne OP fra komplekset hvis det administreres før ”eldring” har utviklet seg (Barthold and Schier, 2005). Overaktivitet av ACh-reseptorer stimulerer bl.a. til krampeanfall og et overskudd av eksitatoriske aminosyrer som glutamat. Glutamat stimulerer NMDA-reseptorer som forlenger krampene og fører til *status epilepticus* og etter hvert nevronal toksisitet (van Helden and Bueters, 1999).

Både muskarinerge og nikotinerge reseptorer er sentrale ved nervegassforgiftning (Hassel, 2006). Toksiske effekter av OP kan dermed deles inn i perifere og sentralnervøse muskarinerge og nikotinerge effekter (Tuovinen, 2004). Perifere muskarinerge symptomer er bl.a. svette, urinering, diaré, bronkospasmer og sikling, mens muskelfascikulasjoner er en perifer nikotinerg effekt. Et sentralt muskarinergt symptom er generaliserte kramper. Respirasjonsdepresjon er et sentralt nikotinergt symptom (Weinbroum, 2004; Hassel, 2006). Standard antidot mot nervegassforgiftning er en muskarinerg antagonist, som atropin, i kombinasjon med et oksim, f.eks HI-6, og et krampedempende middel, f.eks diazepam (Newmark, 2004).

## **1.8 Sentrale hjernestrukturer og glutamattransportører**

### **1.8.1 Hippocampus**

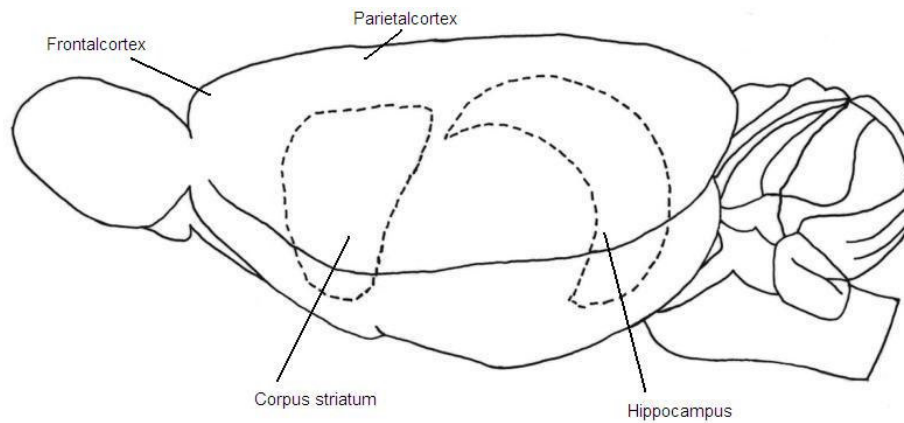
Hippocampus er sentral for innlæring, korttidshukommelse, romlig orientering og emosjonalitet. Denne pølseformede strukturen ligger subkortikalt som skissert i figur 1.2. De nevronale forbindelsene i hippocampus er ordnet, så det er lett å identifisere de ulike grupperingene med synapser og nevroner mikroskopisk. Pyramidecellene i CA1- og CA3-området uttrykker glutamatreseptorer og innerveres av glutamaterge nevroner i entorhinalcortex. Pyramidecellene projakterer videre til septum og subiculum (Andersen et al., 1971).

### **1.8.2 Corpus striatum**

Corpus striatum (heretter kalt striatum) er viktig for initiering og modulering av bevegelse. Striatum er lokalisert subkortikalt, fortil under corpus callosum, se figur 1.2. I forhold til andre hjernestrukturer er andelen projeksjonsnevroner i denne strukturen svært stor, med 90 % GABAerge projeksjonsnevroner. Disse nevronene har glutamatreseptorer og innerveres av glutamaterge nevroner i sensomotorisk cortex og andre deler av hjernebarken, samt fra talamus (Fonnum et al., 1981).

### **1.8.3 Cortex**

Cortex har flere regioner med spesialiserte funksjoner. Den har en overordnet rolle i initiering og regulering av atferd, i behandling og integrering av sanseintrykk og for høyere mentale funksjoner, både kognitive og emosjonelle. Cortex er det ytterste laget av hjernen, se figur 1.2.



**Figur 1.2 Sagittalsnitt av rottehjerne**

Figuren viser de strukturene i rottehjerne som er sentrale for studien.

### 1.8.4 Glutamattransportørene GLT og GLAST

GLT er den kvantitativt viktigste glutamattransportøren i storhjernen (Danbolt et al., 1992; Haugeto et al., 1996) og GLAST er også uttrykt her (Lehre and Danbolt, 1998). GLT er imidlertid mest interessant i vår sammenheng siden det er vist en oppregulering av GLT-nivå i rottehjerne ved AMP-behandling (Rothstein et al., 2005). Områder med høy GLT og/eller GLAST-aktivitet samsvarer med områder med høy glutamaterg innervasjon. GLT er høyest uttrykt i hippocampus, men er også til stede i stor grad i cerebral cortex og striatum. GLAST er hovedsakelig til stede i cerebellum, men finnes også i hippocampus, cerebral cortex og striatum (Lehre et al., 1995).

## **1.9 Problemstilling**

Målene med denne studien var:

- Å undersøke om AMP-behandling kan øke vevsnivået av glutamattransportørene GLT og GLAST i rottehjerne
- Å finne ut om AMP-behandling kan redusere svulstvekst i hjernevev
- Å se om AMP-behandling er i stand til å beskytte hjernevev mot skade som følge av energisvikt
- Å undersøke om AMP-behandling vil beskytte hjernevev mot nevrodegenerasjon etter eksponering for nervegass

## 2 MATERIALE OG METODER

### 2.1 Forsøksdyr

Til *in vivo* forsøk ble det brukt Wistar (HanTac:WH) hannrotter, 200-300 g, fra Møllegaard avlslaboratorier i Ejby, Danmark. Det var 4-5 rotter i hvert bur, og de hadde kontinuerlig tilgang på vann og mat. AMP-behandlede rotter og kontrollrotter ble plassert i samme bur, bortsett fra i forsøket med AMP i 10 dager og AMP og VPA i 14 dager, da like behandlingsgrupper ble plassert sammen. Døgnet var delt inn i 12 timers lys/mørke syklus (automatisk). Luftfuktigheten var  $55 \pm 5$  % og dyrerommene hadde 12-15 luftutskiftninger per time. Temperaturen var  $22 \pm 2$  °C. Lyd- og lysintensiteten ble ikke rutinemessig målt, men rommene var lydisolerte og belysningen dempet. Rottene ble holdt atskilt fra andre dyrearter i forsøksdyravdelingen. Rotter som ble brukt i langtidsforsøk, fikk akklimatisere seg i minst 1 uke, mens dyr som ble brukt i akutforsøk, ble brukt tidligst 2 dager etter ankomst.

Kurs i forsøksdyrlære er gjennomført da dette kreves for å kunne arbeide med forsøksdyr. Forsøkene beskrevet i denne oppgaven er godkjent av Forsøksdyrutvalget.



## 2.2 Kjemikalier

Kjemikalium	Leverandør
2-merkaptoetanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
$\alpha$ -aminoadepinsyre	Sigma, St. Louis, MO, USA
Akrylamid 30 %: N,N'-metylenbisakrylamid 37, 5:1 (akrylamid/-bis) (AMBA)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Aluminiumsulfat ( $\text{AlSO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Anti-A 522 (GLAST)	N.C Danbolt, UiO, Oslo, Norge
Anti-B 493 (GLT)	N.C Danbolt, UiO, Oslo, Norge
Atropinsulfat	Norsk Medisinaldepot, Oslo, Norge
Borsyre ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	Merck, Darmstadt, Tyskland
Bromfenolblått	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenfosfat dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, St. Louis, MO, USA
DL-TBOA	Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA
ECL (enhanced chemoluminescens) deteksjonsreagens 1 og 2	Amersham Biosciences UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, England
Eddiksyre 100 % (iseddik)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Eosin Y	Sigma, St. Louis, MO, USA
Etanol: Absolutt alkohol prima	Arcus Produkter AS, Oslo, Norge
Etylendiamintetraeddiksyre 0,02 % (EDTA) i PBS	Sigma, St. Louis, MO, USA
F-12 (HAM)	Life Technologies, Gibco BRL, Skottland
FluoroJade B	Histo Chem Inc, Jefferson, USA
Føtalt kalveserum (FBS)	Life Technologies, Gibco BRL, Skottland

Geiteseum (GS)	Life Technologies, Gibco BRL, Skottland
Glukose monohydrat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Glyserol 87 %	WWR International, Carnot, Frankrike
Glysin	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Hematoxylin	Sigma, St.Louis, MO, USA
HI-6 diklorid monohydrat	Dr. Boulet, Defence Research Establishment Suffield, Ralston, Alberta, Canada
Hoechst (bisbenzimid H 33342)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hydrogenklorid 37 % (HCl)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Hypnorm <sup>TM</sup>	VetPharma Ltd, Leeds, England
Kaliumklorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kaliumnatriumtartrat tetrahydrat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kaliumpermanganat (KMnO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kalsiumklorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kanin anti mus sekundærantistoff	DAKO, Glostrup, Danmark
Kanin anti rotte sekundærantistoff	DAKO, Glostrup, Danmark
Magnesiumklorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol	Lab-Scan, Analytical Science, Dublin, Irland
Molizo Instant Skummetmelkpulver	Nestlè, Vevey, Sveits
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriummalonat dibasisk monohydrat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumvalproat (2-propyl-1-pentansyre)	Sigma, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-tetrametyletyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

o-phthaldialdehyd (OPA)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd 10 % (PFA, formalin)	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA
PBS (fosfatbufrede salintabletter)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Penicillin (100 IE/ml)/streptomycin (100 µg/ml)	Life Technologies, Gibco BRL, Skottland
Pentobarbital 50 mg/ml	Haukeland Sykehusapotek, Bergen, Norge
Pentrexyl® 2 g	Bristol-Myers Squibb AB, Bromma, Sverige
Periodsyre	Sigma, St. Louis, MO, USA
Prestained Standards, Broad Range	Bio-Rad, CA, USA
Propidiumiodid (PI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Soman	TNO Defence, Security and Safety, Rijswijk, Nederland
Stesolid™ 5 mg/ml	Dumex-Alpha A/S, København, Danmark
Sukrose	BDH Laboratory Supplies, Poole, England
Svin anti kanin sekundærantistoff	DAKO, Glostrup, Danmark
Tissue-Clear®	Sakura Finetek Europe B.V, Zoeterwoude, Nederland
Tissue-Mount®	Sakura Finetek Europe B.V, Zoeterwoude, Nederland
Trizma base	Sigma, Oslo, Norge
TrypLE™ Express	Gibco, Auckland, New Zealand
Tubulin alfa	NeoMarkers, Fremont, CA, USA
Tween 20 (polyoksyetyensorbitan)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Uretan	Sigma, St. Louis, MO, USA
Vogel histo-comp®,	Vogel Medizinische Technik und Elektronik, Giessen, Tyskland
Tissue-Embedding-Medium	
Xylocain adrenalin® 10 mg/ml + 5 µg/ml	AstraZeneca, Oslo, Norge

## 2.3 Western blotting

For å undersøke om AMP-behandling påvirket ekspresjonen av visse proteiner ble prøver fra AMP-behandlede hjerner og kontrollhjerner analysert vha Western blotting. Følgende er en metode for å påvise ulike proteiner. Prosessen består av: 1) separering av proteiner vha gelelektroforese, 2) overføring av proteinbånd til nitrocellulosefilter (blotting), 3) identitetsbestemmelse av bånd ved hjelp av spesifikke antistoffer og 4) visualisering av protein-antistoff-komplekser ved hjelp av kjemoluminescens.

### 2.3.1 Løsninger til Western blotting

#### TBS-T (10x)

Tris base	24,2 g (= 200 mM)
NaCl	80,0 g (=1,37 M)
Tween 20	5 ml
Vann	ad 1000 ml
pH = 7,6	

#### Loadingbuffer (2x)

Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	3 ml
SDS 10 %	4 ml
Glyserol 50 %	2 ml
2-merkaptoetanol	1 ml
Bromfenolblått	noen korn

Running gel (15 geler)

1,5 M Tris pH= 8,8	27,75 ml
Glyserol 50 %	22,5 ml
AMBA 30 %	37,5 ml
Vann	22,5 ml
SDS 10 %	1125 µl

Like før støping tilsettes:

TEMED	5 µl/gel
APS 10 %	50 µl/gel

Stacking gel (10 geler)

0,5 M Tris pH= 6,8	9,2 ml
AMBA 30 %	5 ml
Vann	22,6 ml
SDS 10 %	375 µl

Like før støping tilsettes:

TEMED	5 µl/gel
APS 10 %	50 µl/gel

Tankbuffer (10x)

Tris base	30,25 g (= 0,250 M)
Glysin	144 g (= 1,92 M)
SDS 10 %	100 ml (= 1 %)
Vann	ad 1000 ml

Blottebuffer

Tris base	3,75 g
Glysin	18,0 g
Metanol	500 ml
Vann	2000 ml

### **2.3.2 Støping av geler**

Running gel ble blandet som beskrevet over og ca. 6,5 ml ble fylt mellom to plater i et elektroforesestativ (Bio-Rad Mini-Protean II Slab cell, 1,5 mm spacere). Vann ble lagt på toppen for å sikre en jevn overflate. Etter at gelen hadde stivnet ble vannet tømt av, stacking gel ble lagt på toppen og en kam ble satt i. Gelen stivnet i løpet av 1 time. Kammen ble fjernet, gelen ble skylt med vann og satt i et elektroforesekar (Bio-Rad) med tankbuffer. Det ble brukt en proteinstandard (Prestained Standards, Broad Range, Bio-Rad) med molekylvekt mellom 4 og 250 kDa. Prøver ble applisert på gelen, og elektroforesen ble utført med en spenning på 90 V i 15 min. og deretter 120 V i ca. 2 timer.

### **2.3.3 Gelelektroforese**

Ved hjelp av gelelektroforese kan man separere proteiner etter ladning og molekylvekt da de vandrer med ulik hastighet på en gel i et elektrisk felt. I SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide-gel electrophoresis (Laemmli, 1970)) bindes denaturerte proteiner til SDS, som gjør dem negativt ladet. Bindingen er proporsjonal med molekylvekten, slik at hvert bånd som dannes representerer en bestemt molekylvekt. Båndene identifiseres ved å sammenlikne med proteinstandarden.

### **2.3.4 Immunoblotting**

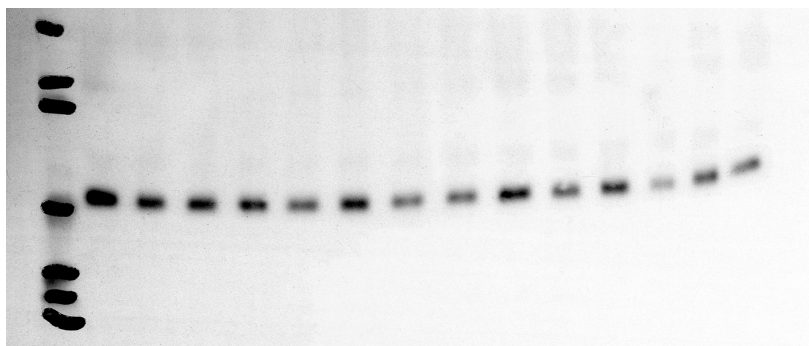
Etter kjørt gelelektroforese ble gelen plassert i et elektroforesekar (Bio-Rad) med blottebuffer. Båndene på gelen ble overført til et nitrocellulosepapir. Blotting skjedde over natt (50 mA) eller i 2 timer (200 mA). Blottet ble så skylt i TBS-T og uspesifikke bindinger ble blokkert med 5 % skummetmelkpulver i TBS-T i minst 1 time.

### 2.3.5 Immunmerking

Blottet ble eksponert for primærantistoff fortynnet i 10 % geiteserum i 2 timer. Antistoffet binder seg til en antigen epitop på det aktuelle proteinet. Deretter ble blottet skylt i TBS-T før sekundært antistoff ble lagt på i 1 time. Dette antistoffet er kovalent bundet til pepperrotperoksydase (HRP). Alle vaskinger og inkubasjoner ble utført under risting på ristebrett (Heidolph Unimax 2010).

### 2.3.6 Kjemoluminesens-deteksjon

Protein-antistoffkomplekset ble visualisert ved at nitrocellulosepapiret ble inkubert med en deteksjonsreagens, ECL, i 1 min. Luminol oksideres av HRP og  $H_2O_2$  i basisk miljø (i nærvær av fenoler). Under oksidasjonen emitteres lys der hvor sekundærantistoff er bundet til primærantistoff. Intensiteten av emittert lys er proporsjonal med mengden bundet antistoff, og dermed med proteinmengden. Filmen (X-Omat Blue Film, Kodak) ble eksponert for blottet i ulike tidslengder i mørkerom. Ved fremkalling i en Kodak fremkallingsmaskin ble det dannet klare bånd (fig. 2.1) og disse ble kvantifisert vha programmet Phoretix 1D Lite.



KTR1-AMP1-KTR2-AMP2-KTR3-AMP3-KTR4-AMP4-KTR5-AMP5-KTR6-AMP6-KTR7-AMP7

**Figur 2.1 Westernblott**

Figuren viser hvordan et Westernblott kan se ut. Dette blottet viser et GLAST-bånd (ved 66 kDa) fra striatum fra AMP-behandlede rotter og kontrollrotter etter 5 dagers behandling.

## **2.4 Effekt av ampicillin på proteinekspresjon**

### **2.4.1 Disseksjon og homogenisering av hjernevev fra rotter behandlet med ampicillin**

Wistar hannrotter (n = 5, 6 eller 7 i hver gruppe) ble merket med tusj på halen før forsøksstart. Det var tilfeldig hvilke som ble kontrollrotter og hvilke som skulle få legemiddel. Rottene ble behandlet med AMP (100 mg/kg x 2) subkutan (s.c.) i 5 eller 10 dager (Rothstein et al., 2005). Kontrollrottene fikk tilsvarende volum (per kilo kroppsvekt) av fysiologisk saltvann s.c. Etter fullført medikamentell behandling og ca. 15-20 timer etter siste dose AMP eller fysiologisk saltvann ble rottene anestisert med CO<sub>2</sub> og dekapitert. Hjernen ble dissekert ut og aktuelle strukturer ble overført til veide eppendorfrør og frosset i flytende nitrogen umiddelbart. De ble så oppbevart ved - 80 °C.

Rottene ble veid ved forsøksstart og forsøksslutt, samt halvveis i forsøket for dosejustering.

De aktuelle strukturene ble homogenisert i 0,32 M sukrose til 0,25 % homogenater og lik mengde loadingbuffer ble tilsatt før prøvene ble kjørt på gelelektroforese. Prosedyren ble ellers fulgt som i avsnitt 2.3.1-2.3.6.



## **2.5 Dyrking av C6 celler**

I forsøket ble det brukt C6 celler fra The European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology and Research, Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, England. C6 er en gliomcellelinje fra rotte med astrocytt som utgangspunkt. C6 cellene ble oppbevart i batcher ved  $-140^{\circ}\text{C}$  kryoprotektert med DMSO. Cellene ble tatt opp av fryseren og satt ett minutt ved romtemperatur før de ble satt på vannbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) til tining. Cellene ble forsiktig suspensert i ca. 11 ml F-12 (HAM) medium med 10 % FBS og penicillin/streptomycin (100 IE/ml penicillin og 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin). Deretter ble cellene dyrket i celledyrkingsflasker (Tissue Culture Flask 75  $\text{cm}^2$ , Sarstedt, Newton, USA) ved  $37^{\circ}\text{C}$  (Forma Scientific  $\text{CO}_2$  water jacketed incubator, Forma Scientific inc., Ohio, USA). Etter ett døgn i inkubatorskap ble mediet byttet for å fjerne DMSO. Cellene ble splittet ca. hver 3.-4. dag avhengig av celletettheten.

### **2.5.1 Splitting av C6 celler**

Mediet ble fjernet og 1 ml EDTA (0,02 %) i PBS ble skylt over cellene for å chelere kalsium som kan frigjøres fra cellene under splittingen. EDTA-løsningen ble fjernet og 1,5 ml TrypLE<sup>TM</sup> Express ble tilsatt. Flasken ble dunket lett slik at cellene løsnet. TrypLE<sup>TM</sup> Express- løsningen med C6 cellene ble overført til falkonrør og tilsatt ca. 5 ml medium og sentrifugert (IEC Centra CL 2, International Equipment Company, Tamro LAB, Vantaa, Finland) ved 1000 rpm i 3 minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble forsiktig suspendert i ca. 1 ml nytt medium. Cellesuspensjonen ble fortynnet til 48 ml med medium og fordelt på fire nye dyrkingsflasker.

### **2.5.2 Klargjøring av C6 celler til implantering**

Celler fra 10 flasker ble behandlet med EDTA og TrypLE<sup>TM</sup> Express som beskrevet i 2.5.1, men etter sentrifugering ble pelleten resuspensert i 1 ml medium og cellene satt til henstand på is i minimum 30 min. slik at cellene fikk sedimentere før implanteringen begynte. Celler til implantering ble trukket opp fra nederste halvdel av sedimentet.

## **2.6 Effekt av ampicillin og valproat på vekst av implanterte C6 celler i striatum hos rotte**

### **2.6.1 Implantering av C6 celler**

Wistar hannrotter (n = 10 i hver gruppe) ble merket med tusj på halen før forsøksstart. Det var tilfeldig hvilke som ble kontrollrotter og hvilke som skulle få legemiddel. Det var 4 eller 5 dyr i hvert bur, og rotter med samme behandling var plassert i samme bur. Rottene ble anestesert ved injeksjon av (per kg kroppsvekt): fentanylcitrat 0,2 mg, fluanison 10 mg og diazepam 5 mg intraperitonealt (i.p.). Deretter ble de montert i en stereotaktisk ramme og huden over skalletaket ble åpnet. Hinner ble snittet og trukket til side slik at bregma ble synlig. Xylocain adrenalin 5 mg/ml + 5 µg/ml ble gitt under skalpen ved behov. Med en butt Terumo 21G kanyler ble det boret et lite hull i skallen rett over høyre striatum (2,5 mm lateralt, 0,5 mm anteriort og 5,5 mm ned fra dura) og dura ble punktert. 2 µl medium med C6 celler (tilsvarende ca  $8,5 \times 10^5$  celler) ble injisert i striatum over 8 min. med en tynn nål. Injeksjonshastigheten (0,25 µl/min) ble kontrollert av en CMA/100 Microinjection Pump m/10 µl Hamilton. Nålen ble fjernet ca. 1 minutt etter endt injeksjon. Etter operasjonen ble huden sydd sammen og rottene ble overvåket til de våknet fra narkosen. Én time etter at cellene ble injisert i striatum, fikk rottene sin første injeksjon av VPA (300 mg/kg), AMP (100 mg/kg) eller tilsvarende volum fysiologisk saltvann s.c.

De påfølgende 14 dagene fikk rottene injeksjoner kl 08 og 16.

### **2.6.2 Perfusjonsfiksering**

Ved endt behandling ble rottene anestesert med Uretan (1,25 g/kg, i.p., påfyll ved behov) (Paulsen and Fonnum, 1989) og perfusjonsfiksert gjennom hjertet. 15 ml iskald NaPi/PBS, 0,1 M, pH 7,4, ble etterfulgt av romtemperert 10 % PFA (Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA, 300-400 ml per rotte). Perfusjonshastigheten var 45 ml/min. Hjernene ble dissekert ut og lagt i 10 % PFA i minst ett døgn. Hjernene ble kryoprotektert ved at de fikk synke i 30 % sukrosløsning, før de ble frosset i flytende nitrogen og oppbevart i fryser ved - 20 °C.

Rottene ble veid ved forsøksstart og forsøksslutt, samt én uke etter forsøkstart for dosejustering.

### **2.6.3 Kryostatsnitting**

Hjernene ble snittet coronalt i kryostat (microm HM 560). De ble snittet ved - 20 °C (kniv) og - 15 °C (prøve). Tykkelsen var 10 µm. Hvert tjuende snitt ble lagt på SuperFrost<sup>®</sup> Plus glass (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Tyskland) og farget med hematoxylin/eosin (HE).

#### 2.6.4 HE-farging av kryostatsnitt

##### Hagens hematoxylin:

- A:     Hematoxylin                      10 g  
         Glyserol                            400 ml  
         Konsentrert iseddik            200 ml  
         Dobbeltdestillert vann        400 ml  
         1 g periodsyre ble tilsatt da det andre var oppløst.
- B:     100 g knust aluminiumsulfat ble løst i 1 liter dobbeltdestillert vann.

Da alt var oppløst ble A og B blandet.

##### 1 % eosin:

- Eosin Y            10 g  
1 liter dobbeltdestillert vann

Snittene ble farget med HE i en Tribune Stainer, modell HCS33 (Senal # 192 4031, Instrumech AS, Norge).

Snittene ble inkubert i følgende løsninger:

- 100 % alkohol            2-5 min.
- 100 % alkohol            2-5 min.
- 96 % alkohol            2-5 min.
- 80 % alkohol            2-5 min.
- Vann                        2-5 min.
- Hematoxylin            5-5:30 min.
- Vann                        5-10 min.
- Eosin                        5-5:30 min.
- Vann                        1-1:10 min.
- 80 % alkohol            1-1:10 min.
- 96 % alkohol            2-2:10 min
- 100 % alkohol           2-2:30 min.
- Tissue-Clear®

Snittene ble deretter montert med Tissue-Mount® og dekkglass (Menzel-Glaser 24 x 60 mm, Tyskland) og tørket før de ble fotografert for måling av svulstvolum.

### **2.6.5 Måling av svulstvolum**

Etter fargingen med HE ble snittene fotografert med Nikon D1X-kamera, 105 mm 1:2,8 D, slik at forstørrelsen var den samme for alle snittene. Svulstarealet i hvert snitt ble målt ved hjelp av ImageJ billedanalyseprogram, der man manuelt markerer svulstens avgrensning. Svulstvolumet ble beregnet som arealet i hvert snitt multiplisert med avstanden mellom snittenes overflate (= 200 µm).

### **2.6.6 Kvalitetskontroll av implanteringsmetoden**

For å undersøke reproduserbarheten av implanteringen, ble estimering av antall injiserte celler foretatt hver dag etter implantering vha telling i tellekammer. 10 µl sedimenterte celler ble fortynnet til 1 ml i F-12 (HAM) medium. 2 µl av denne cellesuspensjonen ble overført til et Burker Bright-line tellekammer (Marienfeld, Lauda- Kőningshofen, Tyskland) med 0,1 mm sjiktdybde. Antall celler per 0,0025 mm<sup>2</sup> ble talt og celletetthet i sedimentet ble beregnet som gjennomsnittet av tre paralleller.

For å undersøke kvaliteten av de implanterte C6 cellene, ble 10 µl sedimenterte celler resuspensert i 1 ml F-12 (HAM) medium og tilsatt 5 µl propidiumiodid (PI) og 2,5 µl Hoechst 33342. Etter 5 minutters eksponering i mørke ble cellene overført til tellekammer som beskrevet over, og antall døde og levende celler ble talt. PI er et fluoriserende fargestoff som kun penetrerer ødelagte membraner, og brukes derfor som en markør for nekrotisk celledød. PI-positive celler (avgir rød fluoresens) anses derfor som nekrotiske. Hoechst 33342 brukes til å detektere cellekjerner med kondensert DNA, slik man ofte ser ved apoptotisk celledød. Hoechst 33342 penetrerer intakte cellemembraner, og binder seg til normalt DNA så vel som til kondensert

DNA. Kondenserte kjerner fremstår som mindre og sterkere lysende enn friske kjerner, fordi fluorescensen i de kondenserte kjernene blir mer konsentrert. Ved hjelp av PI og Hoechst 33342 kan man skille mellom levende celler (store kjerner med svak blåfarge), nekrotiske celler (røde celler) og apoptotiske celler (små kjerner med sterk blåhvitt farge). Størrelse og lysintensitet av Hoechst 33342-positive celler ble sammenliknet med det man ser i friske celler (høstet som beskrevet over og umiddelbart tilsatt PI og Hoechst 33342). Gjennomsnittlig celledød etter alle implanteringer var  $2,8 \% \pm 2,0 \%$ .

## 2.7 Mikrodialyse av implantert gliom i striatum hos rotte

### 2.7.1 Buffere til mikrodialyse

#### Basalbuffer

NaCl	140 mM
KCl	4 mM
NaPi	1,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Glukose	3 mM
pH	7,3

#### Depolariseringsbuffer

NaCl	44 mM
KCl	100 mM
NaPi	1,4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Glukose	3 mM
pH	7,3

### TBOA-buffer

Depolariseringsbuffer tilsatt 500  $\mu$ M DL-TBOA

pH 7,3

### $\alpha$ -aminoadipat/azid-løsning

NaN<sub>3</sub> 0,5 %

$\alpha$ -aminoadipat 100  $\mu$ M

## **2.7.2 Mikrodialyse**

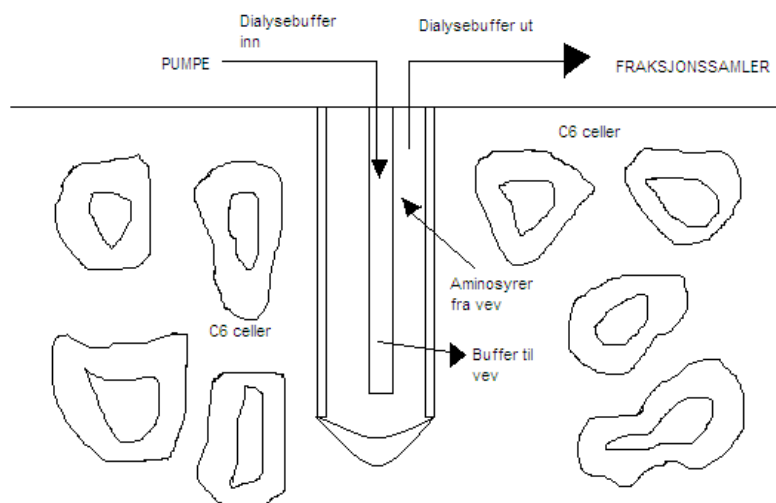
Wistar hannrotter (n = 10 i hver gruppe) med implantert svulst i høyre striatum ble behandlet med VPA (300 mg/kg x 2) eller AMP (100 mg/kg x 2) s.c i 14 dager etter implantering. Kontrollrottene fikk tilsvarende volum (per kilo kroppsvekt) fysiologisk saltvann s.c.

Etter 14 dagers medikamentell behandling ble rottene anestesert med Uretan (1,25 g/kg, i.p., påfyll etter behov) og montert i en stereotaktisk ramme som beskrevet under avsnitt 2.6.1, 2 timer etter siste dose VPA, AMP eller fysiologisk saltvann. En mikrodialyseprobe (CMA/11, Solna, Sverige) ble satt ned i den implanterte svulsten i høyre striatum. Probens plassering ble verifisert ved disseksjon av rottehjerner.

Membranen i proben var 2 mm lang, hadde en ytre diameter på 0,24 mm og en cutoff på 6000 Da. En tilførende slange førte dialyseløsningene til probens kammer. Små molekyler kunne diffundere over den semipermeable membranen fra tilført løsning og ut i ekstracellulærvæsken, og fra ekstracellulærvæsken tilbake til proben (fig. 2.2). Ekvilibreringen var avhengig av strømingshastigheten til væsken gjennom proben. Under forsøket var pumpehastigheten 3  $\mu$ l/minutt. En tynn slange gikk fra probens kammer, slik at fraksjonene kunne samles opp. En bryter på apparaturen gjorde det mulig å veksle mellom tre ulike eksponeringsløsninger. Etter 60 minutters perfusjon med basalbuffer ble det fortløpende samlet opp fraksjoner på 10 minutter. Følgende fraksjoner ble samlet opp: B1 (basalbuffer, 10 min.), B2 (basalbuffer,

påfølgende 10 min.),  $K^+$  (depolariseringsbuffer, 10 min.) og TBOA (depolariseringsbuffer tilsatt 500  $\mu M$  TBOA, 10 min.). TBOA er en kompetitiv hemmer av de  $Na^+$ -avhengige glutamatttransportørene GLT, GLAST og EAAC<sub>1</sub>, og vil derfor hemme glutamatttransport via disse transportørene (Shimamoto et al., 1998; Jabaudon et al., 1999). Mikrodialysefraksjonene (30  $\mu l$ ) ble umiddelbart tilsatt 5  $\mu l$  0,5 %  $NaN_3$  tilsatt  $\alpha$ -aminoadipat (100  $\mu M$ ) som internstandard. Deretter ble fraksjonene analysert for aminosyrenivåer på HPLC.

For å kunne skille effekten av TBOA i depolareringsbufferen fra en effekt av to påfølgende perioder med depolarisering, fikk Wistar hannrotter ( $n = 6$ ) implantert svulst i høyre striatum som beskrevet under avsnitt 2.6.1. Rottene fikk ingen medikamentell behandling i de påfølgende 14 dagene. Mikrodialyse ble utført som beskrevet over, 14 dager etter implantering. I stedet for mikrodialyse med TBOA-buffer ble det samlet dialysat fra ytterligere én fraksjon  $K^+$  (depolariseringsbuffer, 10 min.).



**Figur 2.2 Mikrodialyse i svulstvev**

Figuren viser prinsippet ved mikrodialyse. Buffer diffunderer ut i ekstracellulærvæsken og påvirker vevet rundt. Stoffer i ekstracellulærvæsken diffunderer over membranen og over i dialysebufferen. Fraksjonene samles opp og analyseres.



## 2.8 Analyse av aminosyrer i mikrodialysat ved hjelp av HPLC

### 2.8.1 Derivatisering med OPA

For at aminosyrene skal kunne bli detekterbare med en fluorescensdetektor, måtte prøvene blandes med o-phtaldialdehyd (OPA) i basisk miljø.

#### OPA-reagens:

Blandes i følgende rekkefølge:

o-phtaldialdehyd (OPA)	75 mM
Metanol	10 %
2-merkaptoetanol	1 %
Dobbeltdestillert vann	
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> , pH=12, justert med NaOH	0,4 M

Annenhver dag ble OPA-løsningen aktivert ved å tilsette 50 µl 2-merkaptoetanol.

Stoppreagens (2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ble tilsatt etter ett minutt for å stoppe derivatiseringsreaksjonen. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> senker pH-verdien i blandingen og reaksjonen vil dermed stoppe. Samtidig vil kolonnen beskyttes mot effekten av høy pH som tærer på kolonnematerialet.

## 2.8.2 Separasjon av aminosyrer på HPLC

### HPLC-buffer:

2000 ml 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

pH justeres til eksakt 5,25 med 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Bufferen filtreres og tilsettes 363 ml metanol/ 2020 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -buffer

Instrumentet som ble benyttet til å drive separasjonen var en Hewlett Packard 1100 HPLC med fluorescensdetektor (CMA/280, CMA Microdialysis, Sverige) og integrator (Hewlett Packard 35900E). Aminosyrene ble separert på en C-18 kolonne (Pharmacia Biotech, Sverige, lengde 25 cm, indre diameter 4 mm og partikkelstørrelse 5  $\mu\text{m}$ ) ved hjelp av gradienteluering. HPLC-buffere ble blandet med økende mengde metanol under separasjonen (Paulsen et al., 1987). En Hewlett Packard 1050 autosampler blandet og injiserte ønsket prøvolum på kolonnen. 33  $\mu\text{l}$  prøve ble blandet med 10  $\mu\text{l}$  OPA, og deretter tilsatt 5  $\mu\text{l}$  stopp-reagens.

For å identifisere de ulike toppene, ble retensjonstidene sammenliknet med en kjent aminosyrestandard. Ved å sammenlikne topparealet til den aktuelle aminosyren med topparealet til en intern standard med kjent konsentrasjon ( $\alpha$ -aminoacidipat), kunne mengden av den aktuelle aminosyren i prøven bestemmes. Det ble korrigert for ulik respons i detektoren ved hjelp av en responsfaktor. Responsfaktoren finner man som forholdet mellom topparealet til de to aminosyrene i aminosyrestandardene der de har samme konsentrasjon.

## **2.9 Effekt av ampicillin på malonatindusert celledød i striatum hos rotte**

### **2.9.1 Injeksjon av malonat**

Wistar hannrotter (n = 7 i hver gruppe) ble merket med tusj på halen før forsøksstart. Det var tilfeldig hvilke som ble kontrollrotter og hvilke som skulle få legemiddel. Rottene ble først behandlet med AMP (100mg/kg) eller tilsvarende volum fysiologisk saltvann s.c. kl 08 og 16 i 10 dager. Det var 2 eller 5 dyr i hvert bur, og rotter som fikk samme behandling var plassert i samme bur. Deretter ble rottene anestesert med (per kg kroppsvekt): fentanylcitrat 0,2 mg, fluanison 10 mg og diazepam 5 mg i.p. Rottene ble montert i en stereotaktisk ramme som beskrevet under avsnitt 2.6.1. 1 µl malonat, 1 M, i vann ble injisert i striatum over 4 min. Injeksjonshastigheten (0,25 µl/min) ble kontrollert av en CMA/100 Microinjection Pump m/10 µl Hamilton. Nålen ble fjernet ca. 1 1/2 minutt etter endt injeksjon. Etter operasjonen ble huden sydd sammen og rottene ble overvåket til de våknet fra narkosen. 1 time etter injeksjonen fikk rottene sin første injeksjon av AMP (100 mg/kg) eller tilsvarende volum fysiologisk saltvann s.c.

De påfølgende 2 dagene ble rottene injisert kl 08 og 16, deretter gikk de 5 dager uten medikamentell behandling før de ble anestesert dypt med Pentobarbital og perfusjonsfiksert som beskrevet i avsnitt 2.6.2.

Rottene ble veid ved forsøksstart og forsøksslutt, samt 5 og 10 dager etter forsøksstart for dosejustering.

Hjernene ble snittet coronalt i kryostat og farget med HE som under avsnitt 2.6.3-2.6.5, men snittykkelsen var 20 µm og hvert tiende snitt ble tatt vare på for farging, fotografering og måling av lesjonsvolum vha ImageJ billedanalyseprogram.

## **2.10 Effekt av ampicillin på rotter behandlet med soman**

### **2.10.1 Injeksjon av soman**

Wistar hannrotter ( $n = 7$  i hver gruppe) ble merket med tusj på halen før forsøksstart. Det var tilfeldig hvilke som ble kontrollrotter og hvilke som skulle få legemiddel. Rottene ble først behandlet med AMP (100 mg/kg) eller tilsvarende volum fysiologisk saltvann s.c kl 08 og 16 i 10 dager. Det var 2 eller 5 dyr i hvert bur og rotter som fikk samme behandling var plassert i samme bur. ½ time etter siste dose AMP/NaCl ble HI-6 (125 mg/kg) og atropinsulfat (16 mg/kg) gitt i.p. Etter de fem første rottene ble atropinsulfat kuttet ut for å redusere tiden mellom injeksjon av soman og symptomer. 2 mg soman ble løst i 22,2 ml NaCl og 1 time etter siste dose AMP/NaCl ble soman ( $180 \mu\text{g/kg} = 2,25 \text{ LD}_{50}$ ) (Myhrer et al., 2006) injisert i.p. Atferden til rottene ble observert.

Ca. 1 time etter injeksjonen av soman ble rottene anestesert med Pentobarbital (ca. 330 mg/kg) i.p. og perfusjonsfiksert som beskrevet under avsnitt 2.6.2.

Rottene ble veid ved forsøksstart og forsøksslutt, samt 5 dager etter forsøksstart for dosejustering.

### **2.10.2 Parafininfiltrasjon**

Før impregnering med parafin måtte hjernene dehydreres. Vann fordamper med alkohol til stede. Hjernene ble eksponert for alkohol av gradvis økende konsentrasjon. Tissue-Clear® ble brukt som et klargjøringsmedium, da det er blandbart med både parafin og alkohol. Til slutt ble hjernene innfiltrert med parafin.

Hjernene ble inkubert i følgende løsninger:

- Formaldehyd 10 min.
- Formaldehyd 30 min.
- 70 % alkohol 30 min.
- 96 % alkohol 60 min.
- Absolutt alkohol 60 min.
- Absolutt alkohol 60 min.
- Absolutt alkohol 90 min.
- Tissue-Clear® 90 min.
- Tissue-Clear® 90 min.
- Tissue-Clear® 90 min.
- Parafin 3 timer
- Parafin 3 timer

Totalt: 16 timer 10 min.

### **2.10.3 Parafininnstøping av hjernebiter**

Hjernene ble støpt inn i flytende parafin ved hjelp av en parafininnstøpingsmaskin (Leica EG 1160). Parafinen stivnet og hjernene kunne deretter snittes.

### **2.10.4 Snitting av innstøpte hjerner**

Hjernene ble snittet coronalt i mikrotom (microm HM 355 S) før de ble lagt i et vannbad (Leica HI 1210) på 37 °C slik at snittene ble strukket ut før de ble lagt på Menzel-glaser® objektglass (Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig, Tyskland). Tykkelsen på snittene var 5 µm, med 100 µm mellom hvert snitt. Snittene ble farget med FluoroJade B.

### 2.10.5 FluoroJade B-farging av parafinsnitt

Før farging ble snittene satt i varmeskap ved 37 °C natten over. Snittene ble farget med FluoroJade B i en Tribune Stainer, modell HCS33 (Senal # 192 4031, Instrumech AS, Norge).

Snittene ble inkubert i følgende løsninger:

- Tissue-Clear® 2-5 min.
- Tissue-Clear® 2-5 min.
- 100 % alkohol 2-5 min.
- 100 % alkohol 2-5 min.
- 96 % alkohol 2-5 min.
- 1 % NaOH i 80 % alkohol 5 min.
- 70 % alkohol 2 min.
- Vann 2-3 min.
- Kaliumpermanganat 5 min.
- Vann 2-2:30 min.
- FluoroJade B 20 min.
- Vann 3 min.
- Varming 40 °C 30 min.
- Tissue-Clear®

Deretter ble snittene montert med Tissue-Mount® og dekkglass (Menzel-Glaser® 24 x 60 mm, Tyskland) og tørket før degenererte nevroner i hippocampus ble studert i mikroskop.

## **2.11 Tallbehandling**

### **2.11.1 Resultater**

Resultatene ble oppgitt som middelerdi  $\pm$  SD (standardavvik).

### **2.11.2 Statistikk**

Ved sammenlikning av to grupper ble det brukt Student t-test, paret eller uparet, avhengig av om det var avhengighet mellom verdiene som skulle sammenliknes. Gruppene ble regnet som signifikant forskjellige dersom  $p < 0,05$ .

### **3 RESULTATER**

#### **3.1 Effekt av ampicillin-behandling på GLT og GLAST i rottehjerne**

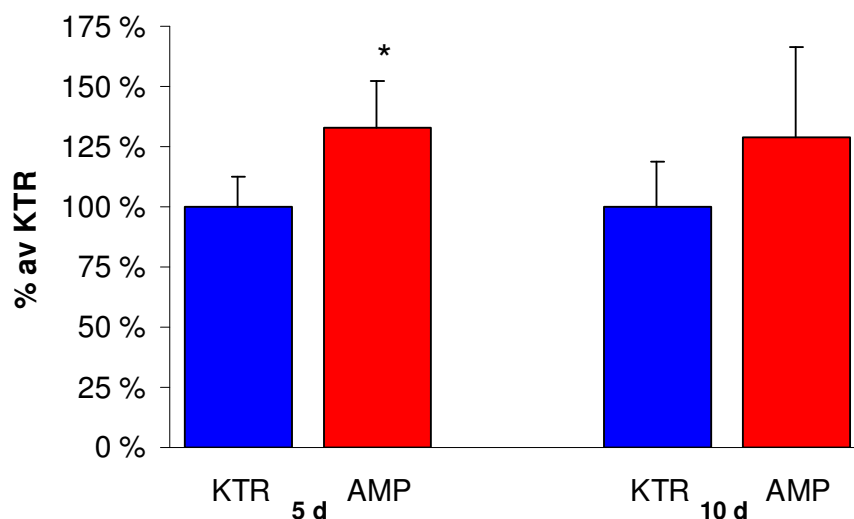
Det er nylig blitt vist at  $\beta$ -laktamantibiotika, deriblant AMP, stimulerer GLT-proteinekspresjon i hippocampus og ryggmarg hos rotte (Rothstein et al., 2005). Vi ønsket å undersøke om dette var tilfelle i ulike strukturer i rottehjerne. Proteinnivåene av GLT og GLAST i hippocampus, striatum og cortex ble undersøkt med Western blotting.

##### **3.1.1 GLT-nivå i hippocampus**

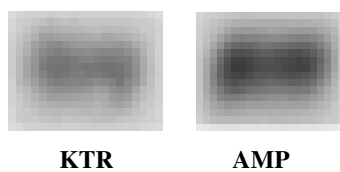
AMP-behandling i 5 dager ga en økning av GLT i hippocampus. 10 dagers AMP-behandling ga ingen forskjell mellom AMP-og kontrollgruppe med hensyn på økt GLT-nivå i hippocampus (fig. 3.1).



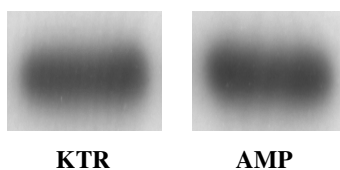
A



B



C



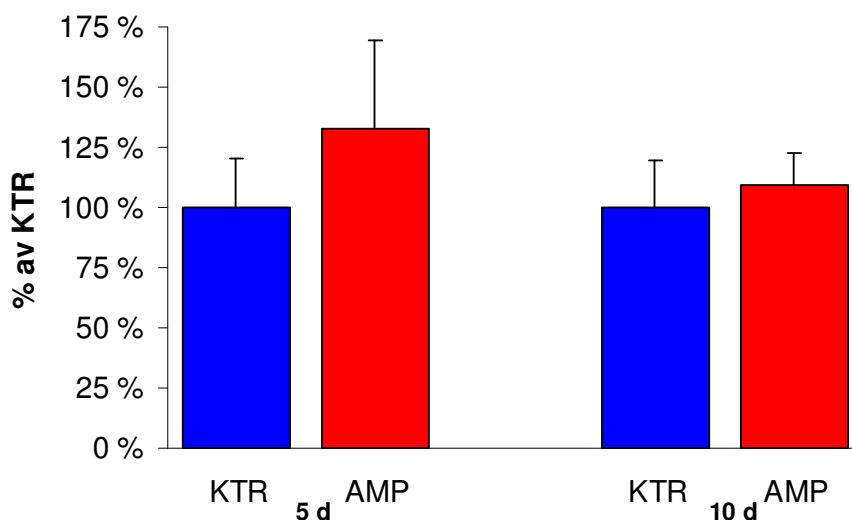
**Figur 3.1 GLT-nivå i hippocampus hos AMP- og NaCl-behandlede rotter**

Wistar hannrotter fikk AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 5 dager ( $n = 7$  i hver gruppe) eller i 10 dager ( $n = 6$  i hver gruppe). GLT-nivået ble målt ved Western blotting. A) Figuren viser immunreaktivitet i forhold til kontroll; gjennomsnitt + SD. \* = forskjellig fra kontroll,  $p = 0,0061$ . For 10 dagers behandling var  $p = 0,16$ ; toveis, uparet t-test. B) GLT-bånd (ved 73 kDa) fra AMP-behandlet rotte og kontrollrotte etter 5 dagers behandling. C)  $\alpha$ -tubulin-bånd (ved 51 kDa) fra AMP-behandlet rotte og kontrollrotte etter 5 dagers behandling. Applikasjon av lik mengde protein i hver brønn ble verifisert ved immunmerking av de samme blottene med antistoff mot  $\alpha$ -tubulin som ikke ble påvirket av AMP-behandlingen. Forkortelser: KTR: kontroll, AMP: ampicillin, d: dager.

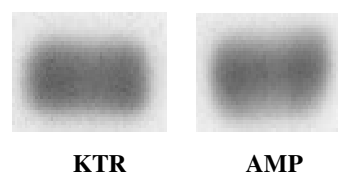
### 3.1.2 GLAST-nivå i hippocampus

AMP-behandling i 5 dager ga en tendens til økt GLAST-nivå i hippocampus. 10 dagers AMP-behandling ga ingen forskjell mellom AMP-og kontrollgruppe med hensyn på økt GLAST-nivå (fig. 3.2).

A



B

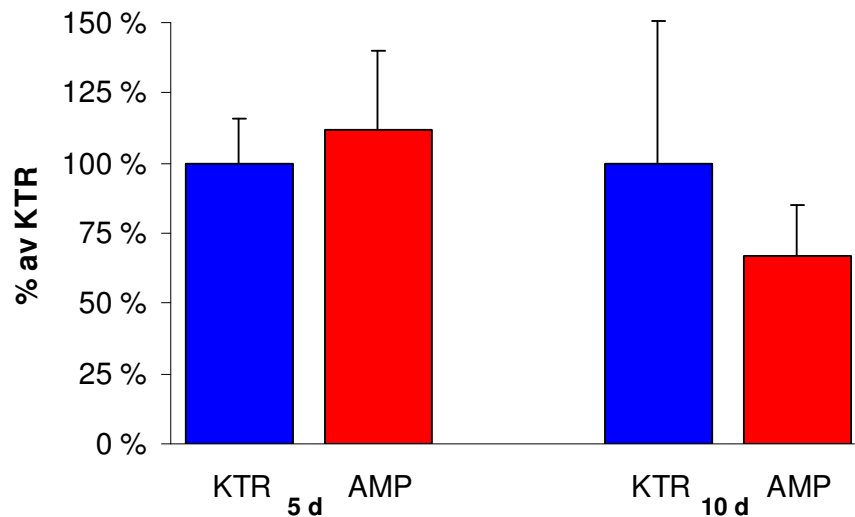


**Figur 3.2 GLAST-nivå i hippocampus hos AMP- og NaCl-behandlede rotter**

Wistar hannrotter fikk AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 5 dager ( $n = 7$  i hver gruppe) eller i 10 dager ( $n = 6$  i hver gruppe). GLAST-nivået ble målt ved Western blotting. A) Figuren viser immunreaktivitet i forhold til kontroll; gjennomsnitt + SD. For 5 dagers behandling var  $p = 0,09$ . For 10 dagers behandling var  $p = 0,39$ ; toveis, uparet t-test. B)  $\alpha$ -tubulin-bånd (ved 51 kDa) fra AMP-behandlet rotte og kontrollrotte etter 10 dagers behandling. Applikasjon av lik mengde protein i hver brønn ble verifisert ved immunmerking av de samme blottene med antistoff mot  $\alpha$ -tubulin som ikke ble påvirket av AMP-behandlingen. Forkortelser: KTR: kontroll, AMP: ampicillin, d: dager.

### 3.1.3 GLT-nivå i striatum

Verken AMP-behandling i 5 eller 10 dager ga noen effekt på GLT-nivået i striatum (fig. 3.3).

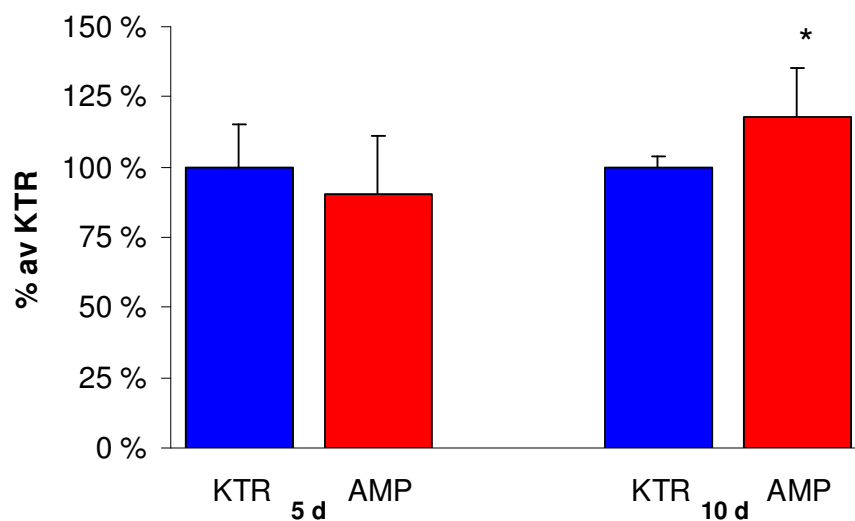


**Figur 3.3 GLT-nivå i striatum hos AMP- og NaCl-behandlede rotter**

Wistar hannrotter fikk AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 5 dager ( $n = 7$  i hver gruppe) eller i 10 dager ( $n = 6$  i hver gruppe). GLT-nivået ble målt ved Western blotting. Figuren viser immunreaktivitet i forhold til kontroll; gjennomsnitt + SD. For 5 dagers behandling var  $p = 0,37$ . For 10 dagers behandling var  $p = 0,22$ ; toveis, uparet t-test. Forkortelser: KTR: kontroll, AMP: ampicillin, d: dager.

### 3.1.4 GLAST-nivå i striatum

AMP-behandling i 5 dager ga ingen forskjell i GLAST-nivået mellom AMP-og NaCl-behandlede rotter i striatum, mens vi fant en økning med 10 dagers behandling (fig. 3.4).

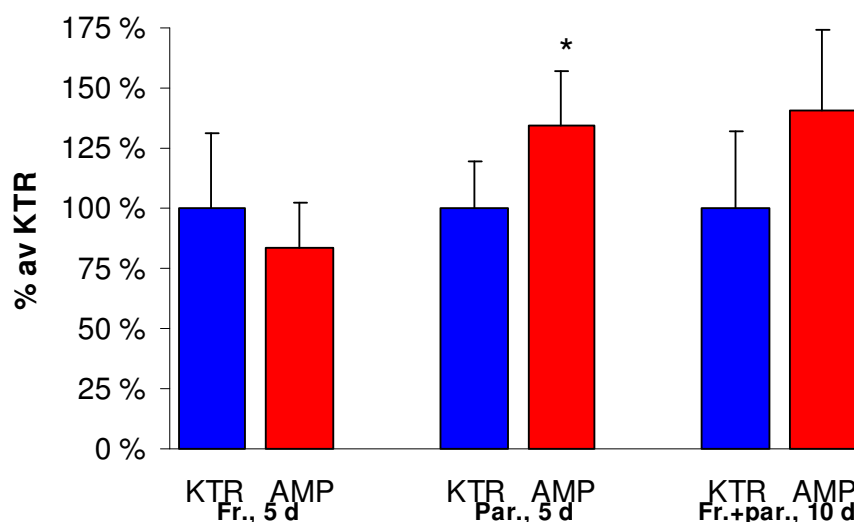


**Figur 3.4 GLAST-nivå i striatum hos AMP- og NaCl-behandlede rotter**

Wistar hannrotter fikk AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 5 dager ( $n = 7$  i hver gruppe) eller i 10 dager ( $n = 6$  i hver gruppe). GLAST-nivået ble målt ved Western blotting. Figuren viser immunreaktivitet i forhold til kontroll; gjennomsnitt + SD. \* = forskjellig fra kontroll,  $p = 0,047$ . For 5 dagers behandling var  $p = 0,39$ ; toveis, uparet t-test. Forkortelser: KTR: kontroll, AMP: ampicillin, d: dager.

### 3.1.5 GLT-nivå i frontal- og/eller parietalcortex

AMP-behandling i 5 dager ga ingen effekt på GLT-nivået i frontalcortex sammenliknet med kontroll, mens GLT-nivået i parietalcortex økte. AMP-behandling i 10 dager ga en mulig tendens til økt GLT-nivå i en kombinasjon av frontal- og parietalcortex (fig. 3.5).



**Figur 3.5 GLT-nivå i frontal- og/eller parietalcortex hos AMP- og NaCl-behandlede rotter**

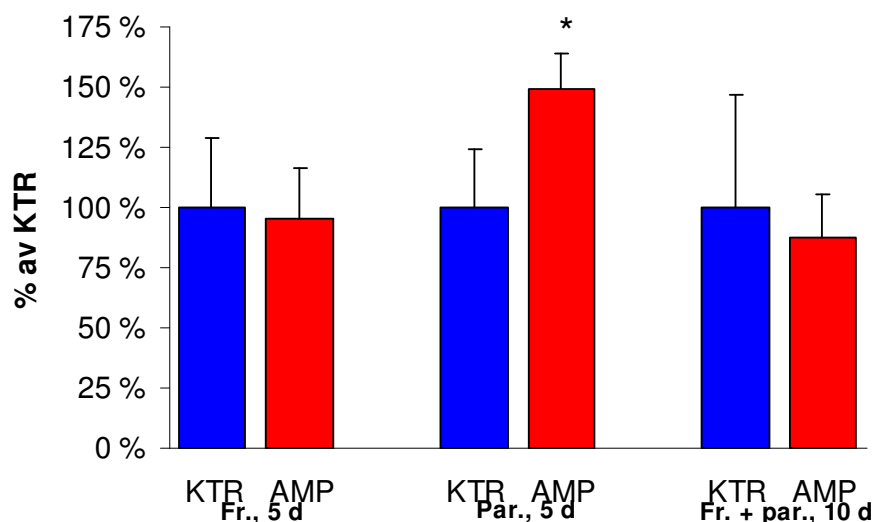
Wistar hannrotter fikk AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 5 dager ( $n = 7$  i hver gruppe) eller i 10 dager ( $n = 6$  i hver gruppe). GLT-nivået ble målt ved Western blotting. Figuren viser immunreaktivitet i forhold til kontroll; gjennomsnitt + SD. \* = forskjellig fra kontroll,  $p = 0,022$ . For 5 dagers behandling var  $p = 0,35$ . For 10 dagers behandling var  $p = 0,11$ ; toveis, uparet t-test.

Forkortelser: KTR: kontroll, AMP: ampicillin, Fr.: frontalcortex, Par.: parietalcortex, Fr.+ par.: kombinasjon av frontal- og parietalcortex, d: dager.

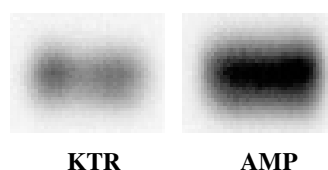
### 3.1.6 GLAST-nivå i frontal- og/eller parietalcortex

GLAST-nivået i frontalcortex ble ikke påvirket av AMP-behandling i 5 dager, mens nivået i parietalcortex økte. AMP-behandling i 10 dager ga ingen effekt på GLAST-nivået i en kombinasjon av frontal- og parietalcortex (fig. 3.6).

A



B



**Figur 3.6 GLAST-nivå i frontal- og/eller parietalcortex hos AMP- og NaCl-behandlede rotter**

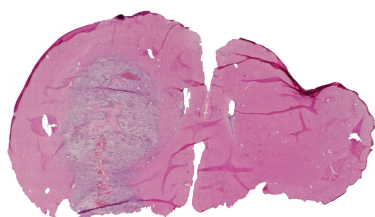
Wistar hannrotter fikk AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 5 dager ( $n = 7$  i hver gruppe) eller i 10 dager ( $n = 6$  i hver gruppe). GLAST-nivået ble målt ved Western blotting. A) Figuren viser immunreaktivitet i forhold til kontroll; gjennomsnitt + SD. \* = forskjellig fra kontroll,  $p = 0,0022$ . For 5 dagers behandling var  $p = 0,78$ . For 10 dagers behandling var  $p = 0,59$ ; toveis, uparet t-test. B) GLAST-bånd (ved 66 kDa) fra parietalcortex fra AMP-behandlet rotte og kontrollrotte etter 5 dagers behandling. Forkortelser: KTR: kontroll, AMP: ampicillin, Fr.: frontalcortex, Par.: parietalcortex, Fr.+ par.: kombinasjon av frontal- og parietalcortex, d: dager.

### 3.2 Effekt av langtids ampicillin- og valproat-behandling på vekst av C6 celler implantert i striatum hos rotter

En hypotese for hvordan gliomer vokser, går ut på at svulstene avgir toksiske mengder glutamat slik at nervecellene rundt svulsten dør og svulstcellene får bedre plass til å vokse (Ye and Sontheimer, 1999). Det er vist AMP-behandling øker GLT-nivået i rottehjerne (Rothstein et al., 2005). Langtidsbehandling med VPA gir oppregulering av GLT i hjernen (Hassel et al., 2001; Morland et al., 2004). Preliminære data (Stokke, 2005) indikerer imidlertid at VPA-behandling kan øke veksten av C6 celler som implanteres i striatum. Vi ønsket derfor å undersøke om AMP kunne hemme veksten av C6 celler i rottestriatum. Samtidig ville vi etterprøve resultatene fra Stokke (2005), og se om effekten av VPA- og/eller AMP-behandling kunne kobles til endringen i uttrykket av glutamattansportørene.

C6 cellene ble implantert i striatum, men det var også vekst langs stikk-kanalen og i parietalcortex over striatum. Svulstene ble derfor delt i en kortikal del og en striatal del, avdelt med corpus callosum, der det var tilnærmet ingen vekst av C6-celler.

Svulstene vokste nokså avgrenset. Dette er utypisk for svulster som oppstår i hjernen da de vanligvis vokser mer infiltrerende (Adams, 1980). Mange av svulstene hadde nekrotisk vev i midten av skaden og fargen her var lysere enn langs ytterkantene (fig. 3.7).

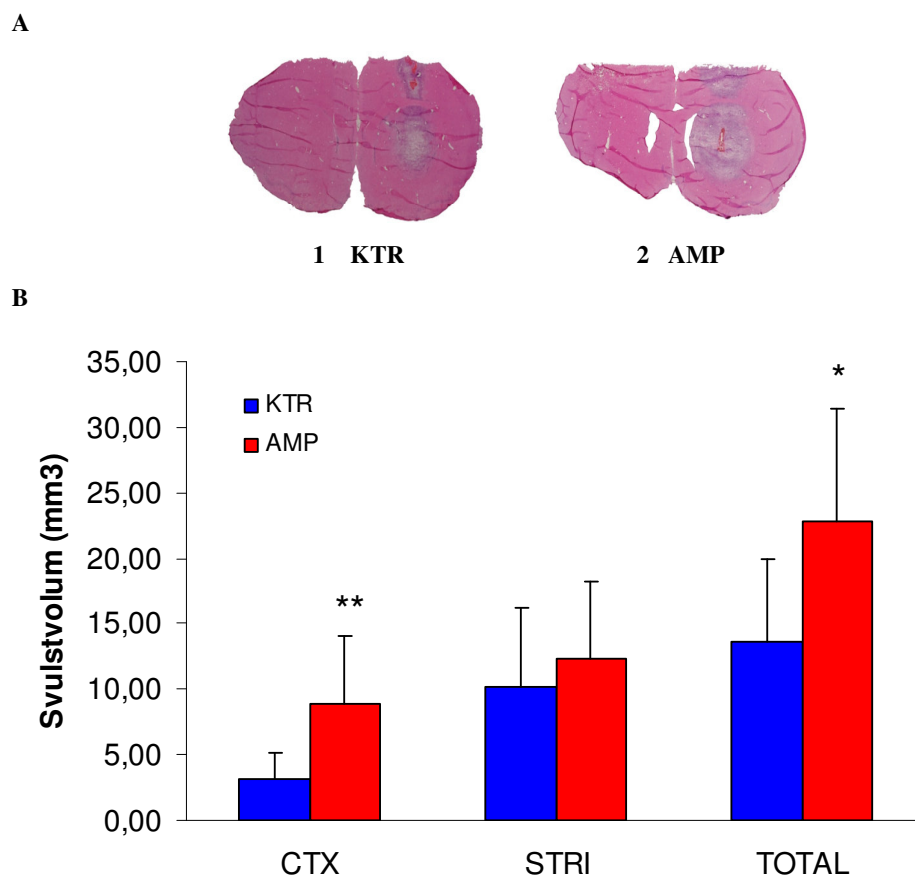


**Figure 3.7 Hjernesnitt av AMP-behandlet rotte**

Figuren viser eksempel på avgrenset vekst og nekrose i midten av svulstvevet

### 3.2.1 Effekt av ampicillin på vekst av C6 celler i rottehjerne

AMP-behandling ga en kraftig økning i svulstvolum i parietalcortex:  $8,96 \pm 5,10 \text{ mm}^3$  i AMP-behandlede dyr versus  $3,22 \pm 1,91 \text{ mm}^3$  i kontrolldyr, men hadde ingen effekt på svulstvolum i striatum (ca.  $10 \text{ mm}^3$  i begge grupper). Totalt sett ga AMP-behandling økt svulstvolum sammenliknet med NaCl-behandling:  $22,78 \pm 8,70 \text{ mm}^3$  versus  $13,57 \pm 6,35 \text{ mm}^3$  (fig. 3.8).



**Figur 3.8 Svulstvolum etter 14 dagers behandling med AMP eller NaCl**

Wistar hannrotter fikk implantert C6 celler i høyre striatum (n = 10 i hver gruppe). De ble deretter behandlet med AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 14 dager. Rottene ble perfusjonsfiksert gjennom hjertet med 10 % PFA før hjernene ble frysesnippet i 10  $\mu\text{m}$  tykke snitt og farget med HE. Svulstvolumet ble målt ved hjelp av ImageJ billedanalyseprogram. A) HE-fargede kryostatsnitt av AMP-behandlet hjerne og kontrollhjerne med implanterte C6 celler i høyre striatum. 1: Kontrollhjerne 2: AMP-behandlet hjerne. B) Svulstvolum i  $\text{mm}^3$ , gjennomsnitt + SD. Asterisker:

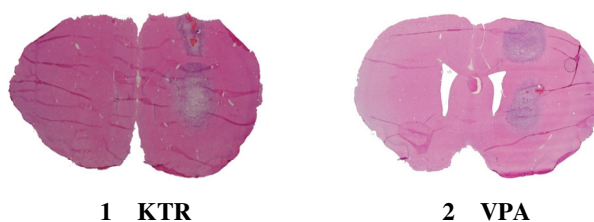


forskjell fra kontroll: \*\*  $p = 0,0049$ , \*  $p = 0,033$ . For striatum var  $p = 0,56$ ; toveis, uparet t-test.  
Forkortelser: KTR: kontroll, AMP: ampicillin, CTX: parietalcortex, STRI: striatum.

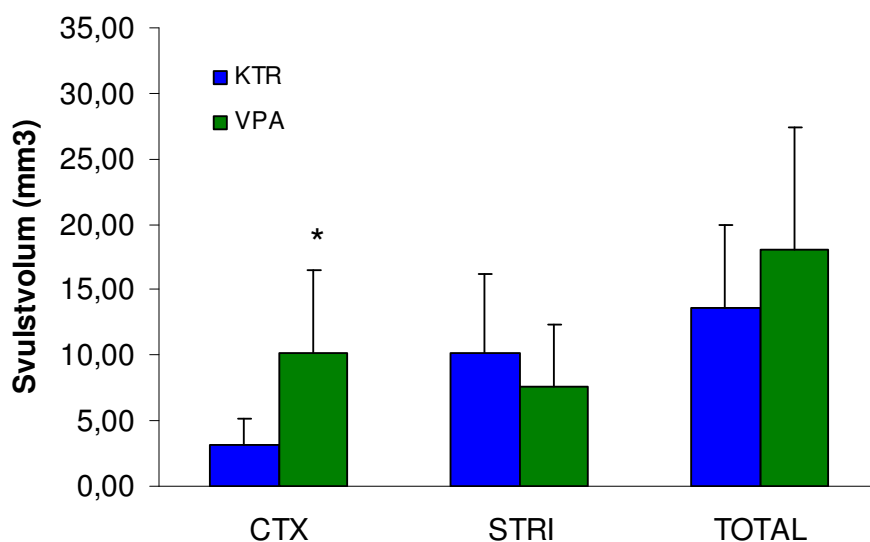
### 3.2.2 Effekt av valproat på vekst av C6 celler i rottehjerne

VPA-behandling ga en kraftig økning i svulstvolum i parietalcortex:  $10,25 \pm 6,23 \text{ mm}^3$  versus  $3,22 \pm 1,91 \text{ mm}^3$ , men ingen endring i svulstvolum i striatum (ca.  $10 \text{ mm}^3$  i begge grupper). Totalt sett ga ikke VPA-behandling noen forskjell i svulstvolum sammenliknet med NaCl-behandling (ca.  $15 \text{ mm}^3$  i begge grupper; fig. 3.9).

A



B



**Figur 3.9 Svulstvolum etter 14 dagers behandling med VPA eller NaCl**

Wistar hannrotter fikk implantert C6 celler i høyre striatum ( $n = 10$  i hver gruppe). De ble deretter behandlet med VPA (300 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 14 dager. Rottene ble

perfusjonsfiksert gjennom hjertet med 10 % PFA før hjernene ble frysesnittet i 10  $\mu\text{m}$  tykke snitt og farget med HE. Svulstvolumet ble målt ved hjelp av ImageJ billedanalyseprogram. A) HE-fargede kryostatsnitt av VPA-behandlet hjerne og kontrollhjerne med implanterte C6 celler i høyre striatum. 1: Kontrollhjerne 2: VPA-behandlet hjerne. B) Svulstvolum i  $\text{mm}^3$ , gjennomsnitt + SD. \* = forskjellig fra kontroll,  $p = 0,0048$ . For striatum var  $p = 0,33$ . For alt svulstvolum sammenlagt (total) var  $p = 0,27$ ; toveis, uparet t-test. Forkortelser: KTR: kontroll, VPA: valproat, CTX: parietalcortex, STRI: striatum.

### 3.3 Mikrodialyse av implanterte C6 celler i høyre striatum hos rotte

Med bakgrunn i at gliomer avgir toksiske mengder glutamat (Ye and Sontheimer, 1999), ønsket vi å undersøke om AMP- og VPA-behandling reduserte det ekstracellulære nivået av glutamat i svulstvev.

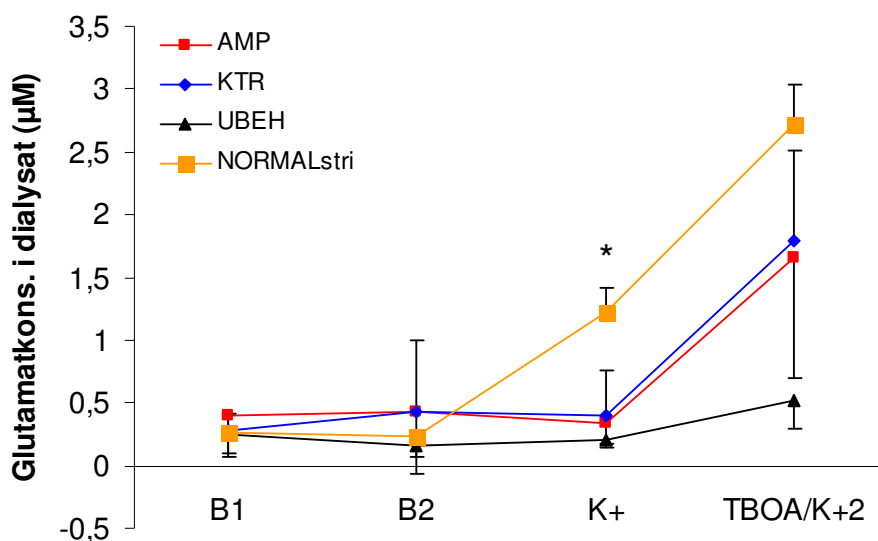
#### 3.3.1 Ampicillins effekt på ekstracellulær glutamat i svulstvev

Perfusjon med basalbuffer i 1 time forut for oppsamling av dialysatet ga stabile glutamatnivåer i begge gruppene, dvs ingen endring fra basalbuffer 1 (B1) til basalbuffer 2 (B2). Depolarisering (100 mM  $\text{K}^+$ , 10 min.) ga ingen stigning i ekstracellulær glutamat i svulstvevet verken for AMP-behandlede dyr eller kontrolldyr (forskjell mellom gruppene;  $p = 0,71$ ). Under dialyse med TBOA i depolariseringsbuffer økte glutamatkonsentrasjonen i begge gruppene, og vi fant ingen forskjell i glutamatkonsentrasjonen mellom gruppene (forskjell mellom gruppene;  $p = 0,72$ ). Imidlertid fant vi en signifikant forskjell både for AMP og KTR med hensyn til en økt glutamatkonsentrasjon i svulstvevet fra depolariseringsbuffer ( $\text{K}^+$ ) til depolariseringsbuffer tilsatt 500  $\mu\text{M}$  TBOA (TBOA: henholdsvis  $p = 0,005$  og  $p = 0,002$ ; toveis, paret t-test).

Fra dyr med implantert svulst, men uten medikamentell behandling, ble det samlet dialysat fra to etterfølgende depolariseringer ( $\text{K}^+$ : 10 min. og  $\text{K}^+2$ : 10 min.) i stedet for depolarisering uten og med TBOA. Her så vi ingen økning i glutamatnivået fra depolariseringsbuffer 1 ( $\text{K}^+$ ) til depolariseringsbuffer 2 ( $\text{K}^+2$ ). Dette indikerer at

økningen vi fant med TBOA, skyldes TBOA i seg selv, og ikke en effekt av forlenget depolarisering.

For å kontrollere forsøksprotokollen ble dialyse utført i striatum på 6 friske, ubehandlede rotter uten svulst. Her fikk vi en økning i glutamatnivået ved depolarisering som forventet, og en ytterligere økning med TBOA (fig. 3.10).

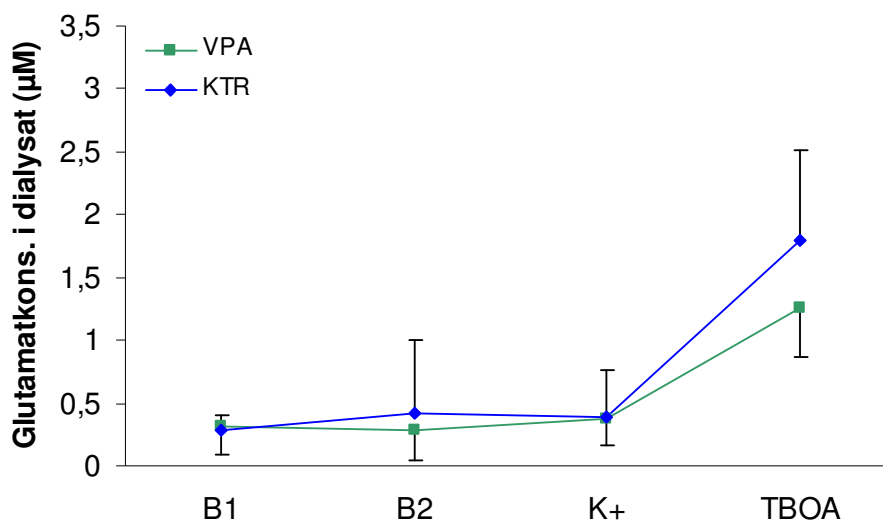


**Figur 3.10 Ekstracellulær glutamatakkumulering i svulstvev**

Wistar hannrotter fikk implantert C6 celler i høyre striatum ( $n = 10$  i hver gruppe). De ble deretter behandlet med AMP (100 mg/kg, rød kurve) eller saltvann (blå kurve) s.c. 2 ganger daglig i 14 dager. En gruppe rotter ( $n = 6$ ) fikk ingen medikamentell behandling etter implantasjonen (svart kurve). Etter 14 dager ble mikrodialyse utført og fire fraksjoner á 10 min. ble samlet opp. Først ble to basalfraksjoner (B1 og B2) samlet opp, deretter én fraksjon depolariseringsbuffer ( $K^+$ ) med 100 mM KCl og deretter én fraksjon TBOA (depolariseringsbuffer tilsatt 500  $\mu$ M TBOA). Fraksjonene ble umiddelbart tilsatt 5  $\mu$ l 0,5 %  $NaN_3$  med  $\alpha$ -aminoadipat (100  $\mu$ M) og glutamatnivået ble analysert på HPLC. I stedet for mikrodialyse med TBOA ble det fra de ubehandlede rottene med svulst samlet dialysat fra ytterligere én fraksjon  $K^+$  ( $K^+2$ ). Gul kurve viser glutamatnivået etter dialyse av normalt strialtalt vev uten svulst. Gjennomsnitt  $\pm$  SD, \* = forskjellig fra B2,  $p = 3,4 \times 10^{-4}$ ; toveis, parett t-test. Forkortelser: Glutamatkons.: glutamatkonsentrasjon, AMP: ampicillin, KTR: kontroll, UBEH: ubehandlede rotter med svulst, NORMALstri: normal striatum uten svulst, B1: basalbuffer 1, B2: basalbuffer 2, K+: depolariseringsbuffer med 100 mM KCl, TBOA: depolariseringsbuffer tilsatt 500  $\mu$ M TBOA, K+2: depolariseringsbuffer 2 med 100 mM KCl.

### 3.3.2 Valproats effekt på ekstracellulær glutamat i svulstvev

Mikrodialyse ble utført som i avsnitt 3.3.1. Depolarisering av svulstvevet ga ingen økning i glutamat, verken i VPA-behandlet gruppe eller kontrollgruppe. Det var ingen signifikante forskjeller i glutamatkonsentrasjonen mellom de to gruppene, verken under basale forhold eller ved depolarisering med 100 mM  $K^+$  (forskjell mellom gruppene;  $p = 0,89$ ). Ved tilsetning av TBOA i dialysebufferen økte glutamatkonsentrasjonen mye for begge grupper, og det var ingen forskjell mellom de VPA-behandlede dyrene og kontrolldyrene (forskjell mellom gruppene;  $p = 0,15$ ). Som for AMP og KTR fant vi også en signifikant forskjell for VPA med hensyn til en økt glutamatkonsentrasjon i svulstvevet fra depolariseringsbuffer ( $K^+$ ) til depolariseringsbuffer tilsatt 500  $\mu M$  TBOA (TBOA:  $p = 0,002$ ; toveis, paret t-test, fig. 3.11).



**Figur 3.11 Ekstracellulær glutamatakkumulering i svulstvev**

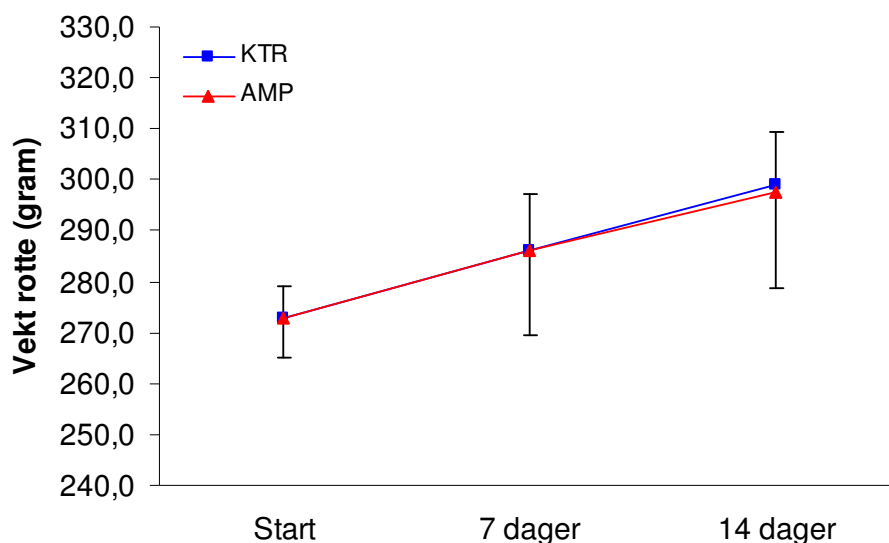
Wistar hannrotter fikk implantert C6 celler i høyre striatum ( $n = 10$  i hver gruppe). De ble deretter behandlet med VPA (300 mg/kg, grønn kurve) eller saltvann (blå kurve) s.c. 2 ganger daglig i 14 dager. Etter 14 dager ble mikrodialyse utført og fire fraksjoner á 10 min. ble samlet opp. Først ble to basalfraksjoner (B1 og B2) samlet opp, deretter én fraksjon depolariseringsbuffer ( $K^+$ ) med 100 mM KCl og deretter én fraksjon TBOA (depolariseringsbuffer tilsatt 500  $\mu M$  TBOA). Fraksjonene ble umiddelbart tilsatt 5  $\mu l$  0,5 %  $NaN_3$  med  $\alpha$ -aminoadipat (100  $\mu M$ ) og glutamatnivået ble analysert på HPLC. Forkortelser: Glutamatkons.: glutamatkonsentrasjon, VPA: valproat, KTR: kontroll, B1:

basalbuffer 1, B2: basalbuffer 2, K+: depolariseringsbuffer med 100 mM KCl, TBOA: depolariseringsbuffer tilsatt 500  $\mu$ M TBOA.

### 3.4 Ampicillin-behandlingens effekt på atferd og vekt

Det var ingen merkbar forskjell verken i atferd eller utseende på AMP-behandlede rotter og kontrollrotter under behandlingsperioden på 14 dager.

Rottene fulgte den samme vektutviklingen (fig. 3.12). Ubehandlede rotter med svulst hadde tilnærmet lik vektutvikling som de to behandlingsgruppene ( $10,6 \pm 3,8$  %, forskjellig fra NaCl-behandlede dyr;  $p = 0,58$ ; data ikke vist).



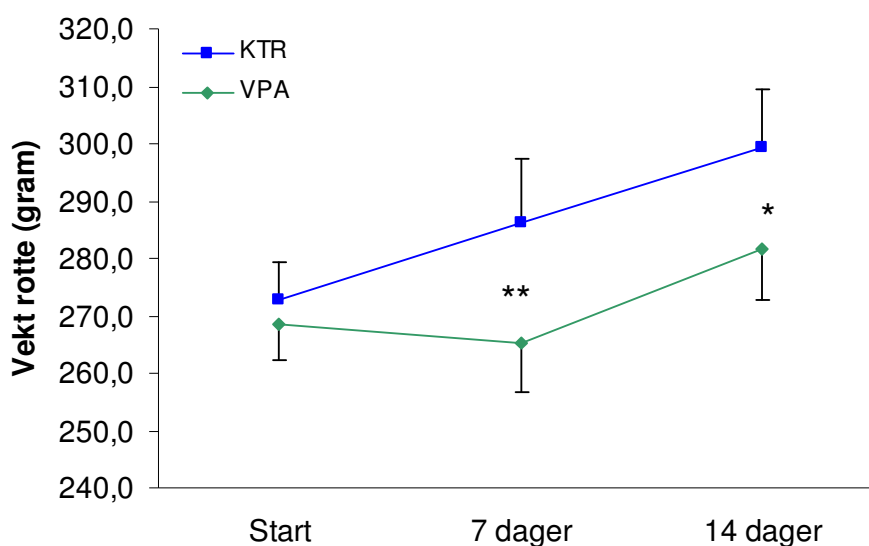
**Figur 3.12 Vektutvikling under behandling med AMP eller NaCl**

Wistar hannrotter fikk implantert C6 celler i høyre striatum ( $n = 10$  i hver gruppe). De ble deretter behandlet med AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 14 dager. En gruppe rotter ( $n = 6$ ) fikk implantert C6 celler i høyre striatum, men fikk deretter ingen medikamentell behandling de påfølgende 14 dagene. Alle rottene ble veid ved forsøksstart, 7 dager etter forsøksstart og ved forsøksslutt. AMP-gruppen hadde en vektøkning på  $9,8 \pm 4,7$  %, kontrollgruppen på  $9,7 \pm 2,7$  % (gjennomsnitt  $\pm$  SD) i løpet av de 14 dagene forsøket varte. Forkortelser: KTR: kontroll, AMP: ampicillin.

### 3.5 Valproat-behandlingens effekt på atferd og vekt

De VPA-behandlede dyrene virket litt trøttere enn kontrollrottene kort tid etter at injeksjonen var gitt. Noen av dem var veldig slappe i kroppen da de ble håndtert, særlig mot slutten av 14-dagersperioden. Disse rottene fikk også rufsete pels og huden virket stiv på de subkutane injeksjonsstedene på ryggen. De fleste fikk også håravfall og sår. Mot slutten ble det derfor vanskelig å finne gode injeksjonssteder. Det så likevel ikke ut som om rottene hadde smerter, og berøring av sårene så ikke ut til å plage dem. Kontrollrottene hadde ikke tilsvarende problemer. Denne bivirkningen av VPA henger sannsynligvis sammen med en rapportert hudirriterende effekt av stoffet (Hellings et al., 2005).

Det var en signifikant reduksjon i vekten hos VPA-rottene sammenliknet med kontrollrottene (fig. 3.13).



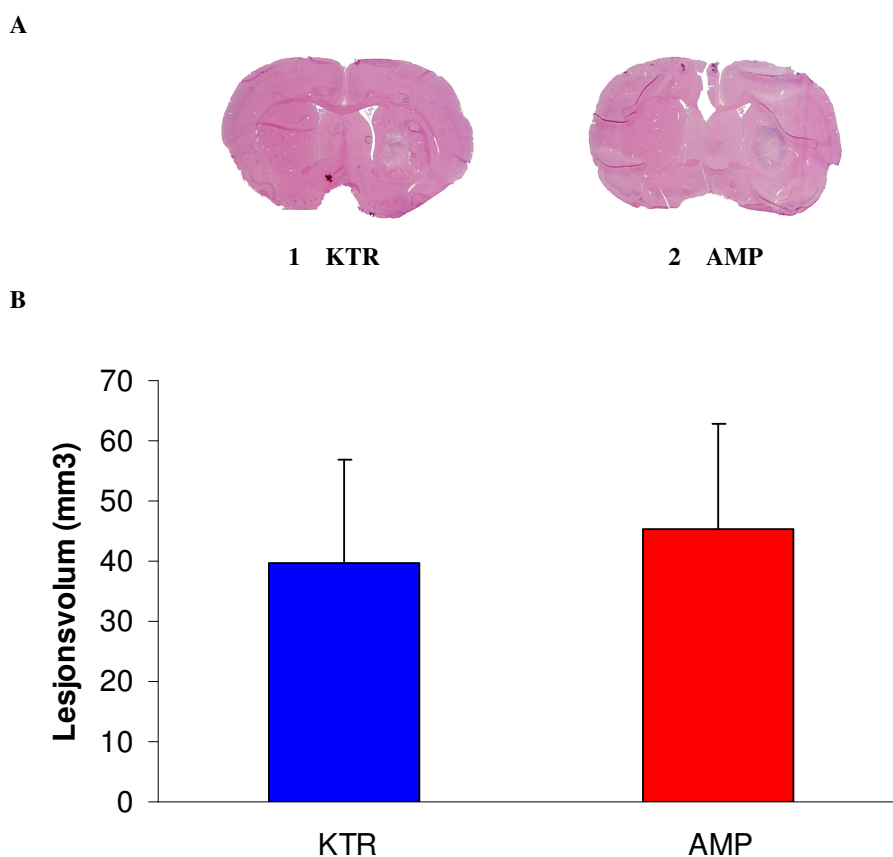
**Figur 3.13 Vektutvikling under behandling med VPA eller NaCl**

Wistar hannrotter fikk implantert C6 celler i høyre striatum ( $n = 10$  i hver gruppe). De ble deretter behandlet med VPA (300 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 14 dager. En gruppe rotter ( $n = 6$ ) fikk implantert C6 celler i høyre striatum, men fikk deretter ingen medikamentell behandling de påfølgende 14 dagene. Alle rottene ble veid ved forsøksstart, 7 dager etter forsøksstart og ved forsøksslutt. VPA-gruppen hadde en vektøkning på  $4,9 \pm 2,6$  %, kontrollgruppen på  $9,7 \pm 2,7$  % (gjennomsnitt  $\pm$  SD) i løpet av de 14 dagene forsøket varte. Asterisker: forskjell fra kontroll:

\*\*  $p = 1,0 \times 10^{-4}$ , \*  $p = 8,0 \times 10^{-4}$ ; toveis, uparet t-test. Forkortelser: KTR: kontroll, VPA: valproat.

### 3.6 Effekt av ampicillin-behandling på malonattoksisitet i striatum hos rotte

Malonat hemmer SDH. Det fører til nedsatt energimetabolisme, som videre fører til glutamatfrisetting og eksitotoksisitet (Greene et al., 1993). Vi ville se om AMP-behandling kunne redusere skaden forårsaket av malonat. Det var ingen forskjell på volumet av malonatindusert skade i de to gruppene (fig. 3.14).



**Figur 3.14 Lesjonsvolum etter 10 + 2 dagers behandling med AMP eller NaCl**

Wistar hannrotter fikk AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 10 dager ( $n = 7$  i hver gruppe). Malonat ble injisert i høyre striatum før AMP (100 mg/kg) eller saltvann ble gitt s.c. 2 ganger

daglig i ytterligere 2 dager. Rottene gikk fem dager uten medikamentell behandling før de ble perfusjonsfiksert med 10 % PFA gjennom hjertet. Hjernene ble frysesnittet i 20  $\mu\text{m}$  tykke snitt og farget med HE. Lesjonsvolum ble målt ved hjelp av Image J billedanalyseprogram. A) HE-fargede kryostatsnitt av AMP- og kontrollhjerne med malonatindusert skade i høyre striatum. 1: Kontrollhjerne 2: AMP-behandlet hjerne. B) Lesjonsvolum i  $\text{mm}^3$ . Gjennomsnitt + SD,  $p = 0,60$ ; toveis, uparet t-test. Forkortelser: KTR: kontroll, AMP: ampicillin.

### **3.7 Effekt av ampicillin-behandling på somanforgiftning i rottehjerne**

Nervegassen soman hemmer AChE, noe som fører til ekstracellulær akkumulering av ACh og etter hvert frigjøring av glutamat (van Helden and Bueters, 1999). Vi ønsket å se om AMP-behandling kunne motvirke effekten av nervegassforgiftning. Både latenstid før somaninduserte kramper og somanindusert nervecelleskade ble undersøkt.

#### **3.7.1 Atferd hos rotter behandlet med soman**

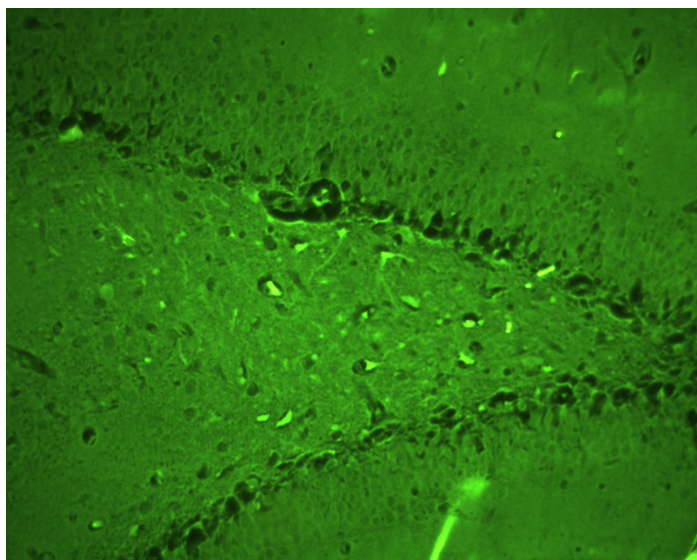
For de fleste rottene tok det bare noen få minutter fra soman ble administrert til de fikk symptomer, mens for noen opptil 30 min. Bruk av HI-6 (og for de fem første rottene, atropinsulfat) skulle holde rottene i live lenge nok til at dyrene utviklet kramper og ev. detekterbar nervecelleskade, siden soman kan ta livet av rottene gjennom respirasjonshemming så raskt at slike parametre ikke kunne måles (Myhrer et al., 2005). Symptomer som var mest fremtredende hos flest rotter var pussing på nesen, tygging, gaping, sikling, fascikulering, muskelkramper, økt muskeltonus, rigiditet og nedsatt koordinasjonsevne. Det var ikke mulig å observere noen forskjell, verken i oppførselen til rottene i de ulike behandlingsgruppene, eller i tiden det tok før de fikk symptomer på nervegassforgiftning. Observasjonene ble ikke kvantifisert.



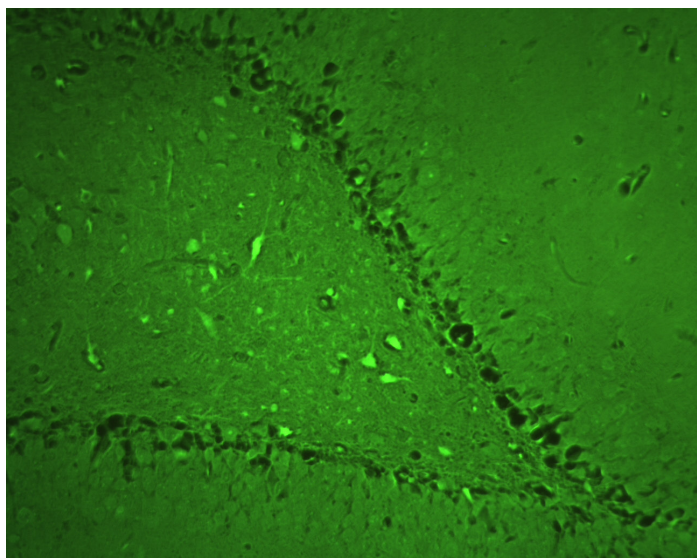
### 3.7.2 Studie av degenererte nevroner i hippocampus

Vi ønsket å se om den skadelige effekten av soman kunne ses som degenerering av nevroner i hippocampus og om AMP-behandling kunne motvirke slik degenerasjon. Hjernene ble støpt inn i parafin og snittet i 5 µm tykke snitt som ble farget med FluoroJade B. Fluorescensbilder ble tatt på tilfeldig utvalgte områder av hippocampus i AMP-behandlet hjerne og NaCl-behandlet hjerne. Det var stor variasjon mellom dyrene og de degenererte nevronene lå spredt og enkeltvis. Vi fant ingen forskjeller i nervecelleskade mellom de ulike delene av hippocampus. Ingen synlig forskjell mellom AMP- og kontrollgruppen kunne ses, heller ikke mellom dem med og dem uten atropin-behandling (fig. 3.15).

A



B



**Figur 3.15 Degenererte nevroner i hippocampus hos AMP- og NaCl-behandlede rotter etter injeksjon av soman**

Wistar hannrotter fikk AMP (100 mg/kg) eller saltvann s.c. 2 ganger daglig i 10 dager ( $n = 7$  i hver gruppe).  $\frac{1}{2}$  time etter siste dose AMP eller NaCl ble HI-6 (125 mg/kg) og atropinsulfat (16 mg/kg) gitt i.p. Atropinsulfat ble seponert etter de fem første rottene. Én time etter siste dose av AMP eller NaCl ble soman ( $180 \mu\text{g/kg} = 2,25 \text{ LD}_{50}$ ) injisert i.p. Ca. én time etter injeksjonen av soman ble rottene perfusjonsfiksert med 10 % PFA gjennom hjertet. Hjernene ble støpt inn i parafin, snittet i  $5 \mu\text{m}$  tykke snitt og farget med FluoroJade B før de kunne studeres i fluoescensmikroskop. Bildene er tatt fra et område med hilusceller, i vinkelen som korncellene i gyrus dentatus danner. A) Kontrollhjerne behandlet med HI-6 og soman. B) AMP-behandlet hjerne med HI-6 og soman.

## 4 DISKUSJON

### 4.1 Analyse av GLT og GLAST i ulike hjernestrukturer

I denne studien ble det sett at AMP-behandling (100 mg/kg x 2) i 5 dager førte til en økning i vevsnivået av høy-affinitets glutamattansportøren GLT i hippocampus og i parietalcortex. Dette er i samsvar med studien til Rothstein et al. (Rothstein et al., 2005), der behandling med en rekke  $\beta$ -laktamantibiotika ble funnet å øke GLT-nivået i hippocampus og ryggmarg hos rotte etter behandling i 5-7 dager. 10 dagers behandling med AMP ga ingen signifikant økning i GLT i vår studie, noe som skiller seg fra studien til Rothstein et al. (2005); i den studien så man en økning i GLT også etter 3 måneder. I de andre hjernestrukturene vi undersøkte, fant vi ingen klare endringer i proteinnivået av GLT.

Vi detekterte en signifikant økning i GLAST-nivået i parietalcortex etter 5 dager og i striatum etter 10 dagers behandling. Disse funnene står i kontrast til hva som er rapportert tidligere (Rothstein et al., 2005), der GLAST, EAAC<sub>1</sub> og EAAT<sub>4</sub> ikke ble påvirket av behandling med  $\beta$ -laktamantibiotika.

Det er noen forskjeller mellom studien til Rothstein et al. (2005) og vår. I den nevnte studien ble AMP administrert intraperitonealt (i.p.), mens vi injiserte legemidlet subkutan (s.c.). Ved i.p. injeksjon vil en stor del av legemidlet passere lever før det distribueres til hjerne. Dette kan påvirke både den systemiske konsentrasjonen av legemidlet, samt at hjernen i større grad kan eksponeres for legemidlets levermetabolitter. Ca. 10 % av AMP metaboliseres til penicilloinsyre, mens 70 % av tilført mengde legemiddel skilles ut uforandret (Felleskatalogen, 2006). Ved i.p. injeksjon kommer legemidlet dessuten raskt ut i blodbanen gjennom opptak i blodkar i bukhinnen. Ved s.c. administrasjon absorberes legemidlet saktere. Dersom en rask økning i konsentrasjonen er vesentlig for å få en økning i ekspresjonen av GLT, kan dette være en mulig forklaring på hvorfor vår studie ikke viste en oppregulering i alle strukturene som ble analysert. Imidlertid kan vi anta at absorpsjon til blodbanen etter s.c. administrering går forholdsvis raskt, slik andre tidligere har erfart (Smith et al.,

2004). Dette understøttes i vår studie av at rottene som ble behandlet med VPA, begynte å vise tegn til søvnighet kort tid etter at dosen ble gitt.

Denne studien viste at AMP-behandling virket forskjellig i ulike hjernestrukturer og lot til å ha forskjellig effekt avhengig av behandlingstiden. Dette tyder på at forskjellige hjerneregioner har ulik regulering av nivået av glutamattansportører, noe også tidligere studier har vist. Kronisk behandling (3 mnd.) med VPA er tidligere vist å øke GLT- og GLAST-nivået i hippocampus, men ikke i lillehjernen eller i neocortex hos rotte (Hassel et al., 2001).

## **4.2 Ampicillins evne til å passere blod-hjerne-barrieren**

Vesentlig penetrasjon av AMP til cerebrospinalvæske og hjerne hos mennesker forekommer først og fremst ved inflammatoriske tilstander i hjernen (SPC, 2005). Dette strider imidlertid mot funnene til Rothstein et al. (2005) og mot våre egne resultater, da AMP ga oppregulering av glutamattansportørnivåer i hjernen på friske rotter etter systemisk administrasjon. Det er mulig at legemidlet passerer blod-hjerne-barrieren (BBB) i liten grad, men at konsentrasjonen likevel ble høy nok til å gi effekt på nivået av glutamattansportørene. Sammenliknet med human dosering (maks 43 mg/kg/døgn, i.m; Felleskatalogen, 2006) er doseringen som vi brukte på rotte nesten det tidobbelte, fordi metabolismen hos rotter er langt raskere enn hos mennesker. Dette resulterer i stor variasjon i serumkonsentrasjonen av AMP i løpet av et døgn hos forsøksdyrene. Man kan tenke seg at konsentrasjonen rett etter administrasjon av legemidlet er høy nok til at AMP kan passere BBB og gi cerebrale effekter. Hos mennesker fordeles dosen på seks i.m. injeksjoner, noe man kan forvente gir et mer stabilt serumspeil. Ut fra dette kan man tenke seg at en effekt av AMP på glutamattansportører hos menneske først og fremst vil kunne forekomme ved meningitt og andre inflammatoriske tilstander, samt ved svulster.

### 4.3 Effekten av ampicillin og valproat på implanterte C6 celler

#### 4.3.1 Ampicillin og valproat stimulerer svulstvekst snarere enn å hemme den

Det er vist at gliomceller frigjør eksitotoksiske mengder glutamat som dreper nervecellene rundt svulstene og slik tilrettelegger for videre svulstvekst (Ye and Sontheimer, 1999; Takano et al., 2001; Sontheimer, 2003). Det er ikke tidligere forsket på AMPs effekt på svulstvekst i rottehjerne. Vi spurte derfor om AMP-behandling ville beskytte vevet rundt svulsten ved å oppregulere GLT- eller GLAST-nivåene i normal striatum og parietalcortex. Det normale vevet skulle dermed bli mer resistent mot glutamaten som svulsten avga. AMP-behandling i 14 dager ga en signifikant økning i svulstvolum i parietalcortex, men hadde ingen effekt på svulstvolum i striatum. Totalt sett ga AMP-behandling et signifikant økt svulstvolum i rottehjerner sammenliknet med NaCl-behandling. Det finnes imidlertid et usikkerhetsmoment i denne studien. Ut fra våre data vet vi kun hvordan oppregulering av glutamattansportørene var etter AMP-behandling i 5 og 10 dager. Vi lot svulstene vokse i 14 dager. Grunnen til det var at det tidligere er sett en rimelig kvantifiserbar svulstvekst etter 14 dagers behandling (Stokke, 2005). Under våre forsøksbetingelser ser det derfor ikke ut til at økt mengde GLT eller GLAST, slik det ble sett i parietalcortex etter 5 dagers AMP-behandling, hindrer gliomer i å vokse. Tvert i mot ser vi at AMP stimulerte svulstveksten. Det er mulig at effekten av AMP blir annerledes ved å endre på parametre som behandlingens lengde, implanteringssted for svulstceller, type svulstceller eller hva slags type dyr som behandles. Dette er imidlertid faktorer man vet svært lite om i forhold til AMP, og som det trengs mer forskning på.

VPA-behandling i 14 dager ga i likhet med AMP-behandling en signifikant økning i svulstvolum i parietalcortex. Dette er i overensstemmelse med resultatene til Stokke (2005). Vi fikk imidlertid større vekst av gliomer i parietalcortex enn det som tidligere er rapportert (Stokke, 2005). Resultatene til Stokke (2005) og våre står i kontrast til et tidligere studium der det ble vist at VPA hemmer svulstvekst *in vivo* (Cinatl et al., 1997). Det er imidlertid flere viktige forskjeller mellom denne nevnte studien og vår. Cinatl et al. (1997) brukte immunkompromitterte (nakne) mus og implanterte

nevroblastomceller (med nevrontalt opphav) subkutan på musene.

Nevroblastomcellene vokste sakte, og VPA-behandlingen gikk over 40 dager. I vår studie ble det brukt C6 celler (med glialt opphav) og immunkompetente rotter. C6 cellene vokste raskt, og VPA-behandlingen ble gitt over bare 14 dager. Forskjellen i resultater mellom disse to studiene kan ha flere forklaringer. Det er mulig at nevroblastomceller og C6 celler reagerer forskjellig på VPA. Det er også mulig at metabolismen av VPA er forskjellig i mus og rotter og at dannelsen av eventuelle aktive metabolitter er forskjellig. Én forskjell er spesielt interessant, nemlig den at mens vi implanterte svulstcellene intracerebralt, ble svulstceller i studien til Cinatl et al. (1997) implantert subkutan. Svulstene var dermed omgitt av muskelvev, fettvev og bindevev. Slikt vev tåler hypoksi og iskemi mye bedre enn hjernevev og det er neppe sårbart for ekstracellulær glutamat. Dessuten er ekspansjonsmuligheten subkutan mye bedre enn intracerebralt, der hodeskallen utgjør en rigid begrensning for vekst. Subkutan vev er løst, og svulsten kan vokse mye uten å måtte fortrenge det normale vevet rundt. På bakgrunn av disse ulikhetene er det ikke sikkert at studien til Cinatl et al. (1997) er så relevant for sammenlikning med vår.

Farmakokinetikken til VPA er forskjellig i ulike dyrearter (Löscher, 1999).

Metabolismehastigheten hos rotter og mennesker er også helt forskjellig.

Halveringstiden i mennesker er 9-18 timer (Perucca, 2002) mens for rotter på 2-4 timer (Löscher, 1999). Metabolismen følger ikke-lineær doseavhengig kinetikk. VPA ble injisert i rottene to ganger daglig, og rottene fikk derfor stor variasjon i serumkonsentrasjonen i løpet av et døgn. Det er mulig at den varierende serumkonsentrasjonen av VPA *in vivo* i rotte har en innvirkning på cellevekst. Hos mennesker vil også konsentrasjonen variere litt, men ikke så mye som hos rotte.

#### 4.3.2 Ampicillin og valproat reduserer ikke ekstracellulær glutamat i svulstvev

Verken AMP- eller VPA-behandling ga endring i basalnivået av glutamat sammenliknet med kontrolldyr. Basalnivået skilte seg heller ikke fra det vi fant i normalt hjernevev, og det var liten variasjon mellom dyrene, til tross for at mikrodialysen ble utført over fire dager. Det viser at systemet vårt var robust og pålitelig over tid.

Ved mikrodialyse av svulstvevet fant vi ingen effekt av depolarisering på glutamatnivået i dialysatet. Dette indikerer at glutamatfrisetting fra gliomene ikke er avhengig av depolarisering. Man ville forvente økt glutamatakkumulering ekstracellulært dersom det var stor grad av glutamatfrisetting gjennom reversering av de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -avhengige transportørene. Våre funn indikerer dermed at reversert glutamattransport ikke er sentralt for frisetting av glutamat i svulstene. En mulig tolkning er at implanterte C6 celler uttrykker få slike transportører. Dette understøttes av funn i Stokkes hovedfagsarbeid (Stokke, 2005) der man fant at GLT-nivået i C6 gliomer bare var 20 % av nivået i normalvev. Det er dessuten blitt hevdet at C6 celler *in vitro* ikke uttrykker GLT i noen særlig grad, mens GLAST hovedsakelig uttrykkes som i normale astrocytter (Ye et al., 1999).

En annen mulig tolkning er at glutamattransportørene ikke reverseres under våre forsøksbetingelser. En slik antakelse stemmer overens med våre data fra dialyse med TBOA, en mye brukt hemmer av GLT, GLAST og EAAC<sub>1</sub> (Shimamoto et al., 1998; Jabaudon et al., 1999). Under eksponering for TBOA økte glutamatnivået signifikant ekstracellulært i alle forsøksgruppene. Dette må tolkes dithen at det finnes TBOA-følsomme glutamattransportører i gliomene, og at disse driver netto opptak av glutamat selv under forholdsvis sterk depolarisering (100 mM KCl i bufferen). Ved å hemme transportørene får man mindre opptak og dermed ekstracellulær akkumulering av glutamat. Denne effekten kan ikke skyldes effekten av forlenget depolarisering (10 min. + 10 min.) da dyr som fikk 20 min. depolarisering uten TBOA i løsningen (dvs. ubehandlede dyr med svulst), viste en mindre økning i glutamat i dialysatet enn rotter med TBOA (dvs. friske rotter uten svulst):  $158 \pm 116$  % økning med kun

depolarisering mot  $1116 \pm 222$  % økning med TBOA under depolarisering (forskjell mellom gruppene;  $p = 1,1 \times 10^{-4}$ ; toveis, uparet t-test).

Verken AMP- eller VPA-behandlede dyr viste noen forskjell i glutamatnivået sammenliknet med kontroll, noe som strider mot at VPA-behandling tidligere er vist å redusere uttrykket av GLT i implanterte C6 celler i striatum (Stokke, 2005).

Vi fikk en kraftig kaliumindusert økning i glutamatnivå i normalt striatalt vev. Dette var som forventet i henhold til tidligere studier (Paulsen and Fonnum, 1989; Morland et al., 2004). Med dette kontrollforsøket utelukket vi feil i forsøksoppsettet som en forklaring på den manglende glutamatstigningen, og viser at systemet vårt er i stand til å detektere en økning i glutamat når den oppstår.

Det er vist at gliomceller frigjør eksitotoksiske mengder glutamat (Ye and Sontheimer, 1999; Takano et al., 2001; Sontheimer, 2003). Dette er en foreslått mekanisme for hvordan svulstene dreper vevet rundt seg og tilrettelegger for egen vekst. Ut fra våre dialysedata finnes det ikke holdepunkter for å si at svulstcellene frigjør toksiske mengder glutamat. Det er imidlertid en svakhet med forsøksoppsettet. I våre forsøk ble dialyseproben satt ned i sentrum av gliomet. Ideelt sett er det glutamatfrisetting i overgangssonen mellom svulstvev og hjernevev som er interessant. Dette fordi det kunne fortelle oss mer om den eventuelle toksiske påvirkningen svulsten har på det omliggende vevet.

#### **4.3.3 Gyldigheten av C6 gliomer som modell for gliomer hos menneske**

C6 celler er opprinnelig fra rotte og forlikelig med vevet. Cellene kan derfor implanteres på immunkompetente rotter. En ulempe ved å bruke C6 celler er at denne cellelinjen er minst 30 år gammel og ikke lenger av opprinnelig genotype. Et annet moment er at gliomer infiltrerer hjernevevet rundt, dvs. de vokser aldri helt avgrenset eller innkapslet (Adams, 1980). Svulstene i vår studie vokste ganske avgrenset, og de er med det kanskje ingen god modell for gliom hos menneske. Avgrenset vekst er mer vanlig ved metastaser til hjernen (Adams, 1980). Det er derfor en mulighet for at C6



gliomer og deres respons på AMP- og VPA-behandling forteller mer om hjernemetastaser og deres eventuelle medikamentelle respons enn om responsen til gliomer.

#### **4.4 Ampicillin-behandling hadde ingen effekt på lesjonsvolumet i striatum etter injeksjon av malonat**

Malonat er en hemmer av enzymet SDH, og er vist å gi nevrodegenerasjon ved injeksjon i striatum (Morland et al., 2004). Det er vist at VPA-behandling virker beskyttende mot malonattoksisitet ved å øke vevsnivået av GLT (Morland et al., 2004). Intrastriatal injeksjon av malonat fører til ekstracellulær akkumulering av glutamat (Messam et al., 1995). AMP-behandling ga ingen beskyttelse mot malonatindusert skade. Årsaken til det kan være fordi AMP-behandling verken i 5 eller 10 dager ga noen økning i GLT-nivået i striatum. Dette ble imidlertid sett i frisk striatum. Det kan ha skjedd en oppregulering i GLT-nivå i rotter behandlet med malonat, men at økningen ikke var stor nok til å gi noen effekt på skaden. Rottene fikk medikamentell behandling i kun 2 dager etter injisert malonat. Nevronskaden kunne kanskje blitt redusert hvis vi hadde gitt medikamentell behandling i flere dager etter injeksjonen. En stor del av malonat forsvinner ut av striatum, både pga. diffusjon og metabolisme (Koeppen et al., 1978). Av den grunn er det nødvendig å gi så høy konsentrasjon som 1 M malonat for å sikre at nevronskade utvikles (Greene and Greenamyre, 1995). Dette er dessuten samme konsentrasjon som ble brukt i et studium av VPAs beskyttende effekt ved malonatindusert skade i striatum (Morland et al., 2004).

## 4.5 Ampicillin-behandling kunne ikke motvirke somanforgiftning

Det var ingen observerbar forskjell mellom AMP- og NaCl-behandlede rotter i atferd etter administrasjon av nervegassen soman. Symptomene som ble observert er typiske for nervegassforgiftning (se avsnitt 1.7). Det var ingen forskjell i latenstid før krampeutvikling eller på alvorlighetsgrad eller varighet av krampeanfallene. Ved eksponering for nervegass skjer en overstimulering av acetylkolinreseptorer, som igjen stimulerer glutamatfrigjøring og gir eksitotoksisitet (van Helden and Bueters, 1999). Westernblott-resultatene viste en oppregulering i GLT-nivå i hippocampus etter 5 dagers behandling med AMP. Til tross for at vevet trolig var mer resistent mot eksitotoksisitet, var det ingen synlig forskjell i antall degenererte nevroner i hippocampus for de to behandlingsgruppene. Somanforgiftningen førte i liten grad til nevrodegenerasjon i hippocampus, noe som gjorde det svært vanskelig å detektere eventuelle forskjeller mellom behandlingsgruppene. Det er en mulighet for at HI-6-dosen (125 mg/kg) var noe høy slik at de eventuelle skadeforskjellene ikke kom tydelig fram. Andre forskere har brukt HI-6-doser på 50 mg/kg (Svensson et al., 2005), men da var imidlertid soman-dosen litt lavere enn i vår studie (100 µg/kg mot 180 µg/kg). Det er derfor vanskelig å antyde hvorvidt en slik konsentrasjonsøkning av HI-6 vil ha betydning for effekten av soman på nevrodegenerasjon. På bakgrunn av våre forsøk er det ikke mulig å si om AMP-behandling gir beskyttende effekt mot nervegassforgiftning eller fører til nevrodegenerasjon.

## 4.6 Mulig virkningsmekanisme for ampicillin

I dette arbeidet er det vist at AMP-behandling stimulerer GLT-ekspressjonen i visse hjernestrukturer. Mekanismen bak denne effekten ser ut til å være aktivering av den genetiske promotoren for GLT (Su et al., 2003). Det er vist at høye doser  $\beta$ -laktamantibiotika (400 mg/kg) har en krampefremmende effekt i mus (Williams et al., 1988). Kramper er også rapportert å være en bivirkning ved overdosering av AMP hos mennesker (Felleskatalogen, 2006). Det kan muligens forklares med legemiddelgruppens antagonistiske effekt på GABA-reseptorer (Williams et al., 1988). En tenkt alternativ mekanisme kan være at AMP hemmer glutamattransport via GLT eller GLAST, noe som kan føre til en oppregulering av transportørene som en kompensasjon for blokkeringen. Dette er en hypotetisk mekanisme av AMP, men *in vitro*-forsøk har vist en kompensatorisk oppregulering av GLAST-nivået i astrocytter ved langtidseksponering (7 dager) for glutamat (Gegelashvili et al., 1996).

## 4.7 Kan ampicillin ha en gunstig effekt ved epilepsi?

AMP brukes ved infeksjoner som f.eks. meningitt, en inflammasjon i hjernehindene. Personer som rammes av meningitt kan utvikle seneffekter som epilepsi (Skrede et al., 2001; Brandtzæg, 2004). Ved energisvikt, som ses ved bl.a. epilepsi, frigjøres glutamat ekstracellulært (Szatkowski et al., 1990). Dette kan føre til *status epilepticus* og etterhvert eksitotoksisk celledød. Vi har vist at AMP-behandling i 5 dager gir en oppregulering av glutamattransportøren GLT i hippocampus i rottehjerne. Dersom dette funnet har overføringsverdi til menneske, og AMP-behandling gir en oppregulering av EAAT<sub>2</sub> i menneskehjerne, er det et aktuelt spørsmål om en slik økning i EAAT<sub>2</sub>-nivået kan påvirke krampeterskelen. I så fall gjelder dette normale doser av AMP, da overdosering av legemidlet som nevnt forårsaker kramper (Felleskatalogen, 2006). Mer forskning er imidlertid nødvendig for å sette fokus på om valg av antibiotika ved meningitt og andre bakterielle infeksjoner i CNS kan påvirke krampeterskelen.

## KONKLUSJON

I denne studien fant vi at AMP-behandling i 5 dager førte til en økning i GLT-nivået i hippocampus og i parietalcortex. Dette samsvarer med funn rapportert av Rothstein et al. (2005). Vi fant også en økning i GLAST-nivået i parietalcortex etter 5 dagers AMP-behandling og i striatum etter 10 dagers behandling. Disse funnene står i kontrast til hva som er funnet tidligere (Rothstein et al., 2005), der GLAST, EAAC<sub>1</sub> og EAAT<sub>4</sub> ikke ble påvirket av behandling med  $\beta$ -laktamantibiotika. Behandling med AMP hadde ingen hemmende effekt verken på svulstvekst, malonatinduserte lesjoner eller somaninduserte kramper. Ut fra disse funnene kan man sette spørsmålstegn ved nytten av AMP-behandling ved nevrodegenerative tilstander.

## REFERANSER

Adams J (1980) Tumours in the nervous system. In: Muir's Textbook of Pathology (Anderson JR, ed), pp 783-794: London: Arnold.

Andersen P, Bliss TV, Skrede KK (1971) Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res* 13:208-221.

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4155-4160.

Baker DA, Xi ZX, Shen H, Swanson CJ, Kalivas PW (2002) The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. *J Neurosci* 22:9134-9141.

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3:205-214.

Barthold CL, Schier JG (2005) Organic phosphorus compounds--nerve agents. *Crit Care Clin* 21:673-689, v-vi.

Beal MF, Brouillet E, Jenkins B, Henshaw R, Rosen B, Hyman BT (1993) Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J Neurochem* 61:1147-1150.

Blaheta RA, Cinatl J, Jr. (2002) Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* 22:492-511.

Bouzier AK, Quesson B, Valeins H, Canioni P, Merle M (1999) [1-(13)C]glucose metabolism in the tumoral and nontumoral cerebral tissue of a glioma-bearing rat. *J Neurochem* 72:2445-2455.

Brandtzæg P (2004) T1.10 Akutt bakteriell meningitt. In: Norsk legemiddelhåndbok (Vilberg A, ed). Oslo: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok.

- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- Chung WJ, Lyons SA, Nelson GM, Hamza H, Gladson CL, Gillespie GY, Sontheimer H (2005) Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors. *J Neurosci* 25:7101-7110.
- Cinatl J, Jr., Cinatl J, Driever PH, Kotchetkov R, Pouckova P, Kornhuber B, Schwabe D (1997) Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 8:958-963.
- Danbolt NC (1994) The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog Neurobiol* 44:377-396.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI (1992) An [Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51:295-310.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599-603.
- Felleskatalogen 2006: Pentrexyl, Bristol-Myers Squibb  
[www.felleskatalogen.no](http://www.felleskatalogen.no) (sist aksessert 22.10.06)
- Ferger B, Eberhardt O, Teismann P, de Groote C, Schulz JB (1999) Malonate-induced generation of reactive oxygen species in rat striatum depends on dopamine release but not on NMDA receptor activation. *J Neurochem* 73:1329-1332.
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42:1-11.

- Fonnum F, Storm-Mathisen J, Divac I (1981) Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and corticothalamic fibres in rat brain. *Neuroscience* 6:863-873.
- Gegelashvili G, Civenni G, Racagni G, Danbolt NC, Schousboe I, Schousboe A (1996) Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* 8:261-265.
- Gram L (1988) Experimental studies and controlled clinical testing of valproate and vigabatrin. *Acta Neurol Scand* 78:241-270.
- Greene JG, Greenamyre JT (1995) Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* 64:430-436.
- Greene JG, Porter RH, Eller RV, Greenamyre JT (1993) Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. *J Neurochem* 61:1151-1154.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20:6969-6978.
- Hashimoto R, Hough C, Nakazawa T, Yamamoto T, Chuang DM (2002) Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. *J Neurochem* 80:589-597.
- Hassel B (2006) Nicotinic mechanisms contribute to soman-induced symptoms and lethality. *Neurotoxicology* 27:501-507.
- Hassel B, Sonnewald U (1995) Glial formation of pyruvate and lactate from TCA cycle intermediates: implications for the inactivation of transmitter amino acids? *J Neurochem* 65:2227-2234.

- Hassel B, Bråthe A (2000) Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate. *J Neurosci* 20:1342-1347.
- Hassel B, Dingledine R (2006) Glutamate. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL), pp 267-290: New York: Elsevier.
- Hassel B, Bråthe A, Petersen D (2002) Cerebral dicarboxylate transport and metabolism studied with isotopically labelled fumarate, malate and malonate. *J Neurochem* 82:410-419.
- Hassel B, Iversen EG, Gjerstad L, Taubøll E (2001) Up-regulation of hippocampal glutamate transport during chronic treatment with sodium valproate. *J Neurochem* 77:1285-1292.
- Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271:27715-27722.
- Hellings JA, Weckbaugh M, Nickel EJ, Cain SE, Zarcone JR, Reese RM, Hall S, Ermer DJ, Tsai LY, Schroeder SR, Cook EH (2005) A double-blind, placebo-controlled study of valproate for aggression in youth with pervasive developmental disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 15:682-692.
- Ikonomidou C, Stefovskaja V, Turski L (2000) Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12885-12890.
- Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8733-8738.
- Ji HF, Shen L, Zhang HY (2005) Beta-lactam antibiotics are multipotent agents to combat neurological diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 333:661-663.



- Johannessen CU (2000) Mechanisms of action of valproate: a commentary. *Neurochem Int* 37:103-110.
- Kanai Y, Hediger MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360:467-471.
- Kanner BI, Schuldiner S (1987) Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *CRC Crit Rev Biochem* 22:1-38.
- Ko GY, Brown-Crofts LM, Teyler TJ (1997) The effects of anticonvulsant drugs on NMDA-EPSP, AMPA-EPSP, and GABA-IPSP in the rat hippocampus. *Brain Res Bull* 42:297-302.
- Koeppen AH, Mitzen EJ, Papandrea JD (1978) Metabolism of malonic acid in rat brain after intracerebral injection. *J Neurochem* 31:739-745.
- Kræftens Bekæmpelse 2006  
<http://www.cancer.dk/alt+om+kraeft/kraeftsygdomme/hjernesvulster/tilbagefaId+af+hjernesvulster1.asp> (sist aksessert 25.09.2006)
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lehre KP, Danbolt NC (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18:8751-8757.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-1853.
- Levy LM, Warr O, Attwell D (1998) Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake. *J Neurosci* 18:9620-9628.

- Löscher W (1999) Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Prog Neurobiol* 58:31-59.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356-1358.
- McDonough JH, Jr., Shih TM (1997) Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 21:559-579.
- McLean MJ, Macdonald RL (1986) Sodium valproate, but not ethosuximide, produces use- and voltage-dependent limitation of high frequency repetitive firing of action potentials of mouse central neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* 237:1001-1011.
- Messam CA, Greene JG, Greenamyre JT, Robinson MB (1995) Intrastriatal injections of the succinate dehydrogenase inhibitor, malonate, cause a rise in extracellular amino acids that is blocked by MK-801. *Brain Res* 684:221-224.
- Morland C, Boldingh KA, Iversen EG, Hassel B (2004) Valproate is neuroprotective against malonate toxicity in rat striatum: an association with augmentation of high-affinity glutamate uptake. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:1226-1234.
- Myhrer T, Enger S, Aas P (2006) Efficacy of immediate and subsequent therapies against soman-induced seizures and lethality in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98:184-191.
- Myhrer T, Andersen JM, Nguyen NH, Aas P (2005) Soman-induced convulsions in rats terminated with pharmacological agents after 45 min: neuropathology and cognitive performance. *Neurotoxicology* 26:39-48.
- Newmark J (2004) Therapy for nerve agent poisoning. *Arch Neurol* 61:649-652.
- Nicholls D, Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11:462-468.

- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res* 451:205-212.
- Patel TB, Olson MS (1982) Evidence for the regulation of the branched chain alpha-keto acid dehydrogenase multienzyme complex by a phosphorylation/dephosphorylation mechanism. *Biochemistry* 21:4259-4265.
- Paulsen RE, Fonnum F (1989) Role of glial cells for the basal and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-evoked release of transmitter amino acids investigated by microdialysis. *J Neurochem* 52:1823-1829.
- Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F (1987) An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J Neurochem* 48:1377-1385.
- Perucca E (2002) Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs* 16:695-714.
- Petroff OA, Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Mattson RH (1999) Effects of valproate and other antiepileptic drugs on brain glutamate, glutamine, and GABA in patients with refractory complex partial seizures. *Seizure* 8:120-127.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276:36734-36741.
- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464-467.
- Ren M, Leng Y, Jeong M, Leeds PR, Chuang DM (2004) Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *J Neurochem* 89:1358-1367.

- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77.
- Schoepp DD, Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 14:13-20.
- Schulz JB, Henshaw DR, Siwek D, Jenkins BG, Ferrante RJ, Cipolloni PB, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF (1995) Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *J Neurochem* 64:2239-2247.
- Seeburg PH (1993) The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 16:359-365.
- Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, Sakaitani M, Shigeri Y, Yumoto N, Nakajima T (1998) DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol* 53:195-201.
- Skrede S, Sjursen H, Solberg CO (2001) Behandling av akutt bakteriell meningitt. *Tidsskr Nor Legeforen* 121:3306-3309.
- Smith A, Hem A, Eide D, Poppe T (2004) Injeksjonsteknikker. In: *Kompendium i forsøksdyrlære* (Hem A, Eide D, Engh E, Smith A, eds), pp 158-160. Oslo: Norges veterinærhøgskole.
- Sontheimer H (2003) Malignant gliomas: perverting glutamate and ion homeostasis for selective advantage. *Trends Neurosci* 26:543-549.

- Sontheimer H (2004) Ion channels and amino acid transporters support the growth and invasion of primary brain tumors. *Mol Neurobiol* 29:61-71.
- SPC (preparatomtale) 2005: Ampicillin, Bristol-Myers Squibb  
www.legemiddelverket.no (sist aksessert 20.10.06)
- Stokke M (2005) Valproat reduserer vekst av C6 celler *in vitro*, men øker vekst av C6 celler *in vivo*.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10955-10959.
- Su ZZ, Leszczyniecka M, Kang DC, Sarkar D, Chao W, Volsky DJ, Fisher PB (2003) Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1955-1960.
- Svensson I, Waara L, Cassel G (2005) Effects of HI 6, diazepam and atropine on soman-induced IL-1 beta protein in rat brain. *Neurotoxicology* 26:173-181.
- Szatkowski M, Barbour B, Attwell D (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348:443-446.
- Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M (2001) Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med* 7:1010-1015.
- Tavares RG, Santos CE, Tasca CI, Wajner M, Souza DO, Dutra-Filho CS (2001) Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain by 3-nitropropionic acid *in vitro*. *Exp Neurol* 172:250-254.
- Taylor P (1995) Anticholinesterase agents. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9 th Edition (Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Gilman A, eds), pp 161-176. New York: McGraw-Hill.

- Tuovinen K (2004) Organophosphate-induced convulsions and prevention of neuropathological damages. *Toxicology* 196:31-39.
- van Helden HP, Bueters TJ (1999) Protective activity of adenosine receptor agonists in the treatment of organophosphate poisoning. *Trends Pharmacol Sci* 20:438-441.
- Weinbroum AA (2004) Pathophysiological and clinical aspects of combat anticholinesterase poisoning. *Br Med Bull* 72:119-133.
- Williams PD, Bennett DB, Comereski CR (1988) Animal model for evaluating the convulsive liability of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 32:758-760.
- Ye ZC, Sontheimer H (1999) Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 59:4383-4391.
- Ye ZC, Rothstein JD, Sontheimer H (1999) Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J Neurosci* 19:10767-10777.
- Zeevalk GD, Nicklas WJ (1992) Evidence that the loss of the voltage-dependent  $Mg^{2+}$  block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem* 59:1211-1220.